

Juliana Ben

**INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO NÍVEL E NA
ATIVACÃO DE PROTEÍNAS CINASES NO NEOCÓRTEX E NO
HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO
MODELO DE *KINDLING* POR PENTILENOTETRAZOL**

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Neurociências,
da Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do grau de
Doutora em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel
Schröder Prediger

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo
Bainy Leal

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ben, Juliana

INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO NÍVEL E NA ATIVAÇÃO DE
PROTEÍNAS CINASES NO NEOCÓRTEX E NO HIPOCAMPO DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE KINDLING POR
PENTILENOTETRAZOL / Juliana Ben ; orientador, Rui Daniel
Schröder Prediger ; co-orientador, Rodrigo Bainy Leal. -
Florianópolis, SC, 2014.
130 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

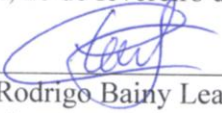
1. Neurociências. 2. Epilepsia. 3. Kindling por PTZ. 4.
Moléculas de sinalização celular. 5. Biomarcadores. I.
Schröder Prediger, Rui Daniel. II. Bainy Leal, Rodrigo.
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

JULIANA BEN

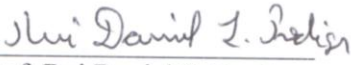
**“INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO NÍVEL E NA
ATIVÇÃO DE PROTEÍNAS CINASES NO
NEOCÓRTEX E NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS AO MODELO DE KINDLING POR
PENTILENOTETRAZOL”.**

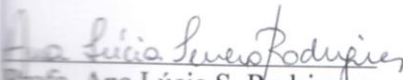
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no
Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina

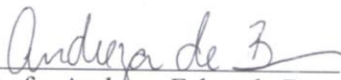
Florianópolis, 28 de fevereiro de 2014.

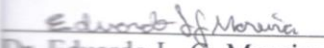

Prof. Rodrigo Bainy Leal
Coordenador do Curso

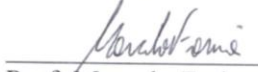
Banca Examinadora:

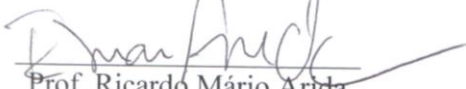

Prof. Rui Daniel S. Prediger
Orientador – UFSC


Profa. Ana Lúcia S. Rodrigues
Membro - UFSC


Profa. Andreza Fabro de Bem
Membro - UFSC


Dr. Eduardo L. G. Moreira
Membro da Banca Externo


Prof. Marcelo Farina
Membro - UFSC


Prof. Ricardo Mário Arida
Membro da Banca Externo

*Dedico esta Tese ao meu marido,
Roger Walz, simplesmente por
tudo!!!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Roger Walz, que esteve do meu lado por esse longo caminho cheio de obstáculos e dificuldades, sempre me apoiando e incentivando a continuar e a enxergar a pesquisa científica de uma maneira muito mais estimulante. Muito obrigada por ser meu amado companheiro.

À minha família, em especial à minha mãe Ana Maria Freitag, por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida, me apoiando e confortando incondicionalmente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger, pela oportunidade, confiança e liberdade para realização desta Tese de Doutorado e pela amizade que tenho certeza que levarei para a vida.

Ao meu co-orientador e amigo, Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelos ensinamentos e incentivos durante esse período. Sempre é bom receber um elogio pelo trabalho realizado.

Aos colegas do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON), Filipe, Daniel, Aderbal, Vanessa, Eduardo, Sandro, Samantha, Carolina, Morgana, Josiel, Jozimar e Andréia, pela boa convivência, aprendizagem e amizade, especialmente ao Paulo Alexandre de Oliveira que me ajudou diretamente nos experimentos relacionados à tese.

Aos colegas do Laboratório de Neuroquímica III, Débora, Ana Paula e Mark Willian, pelas contribuições e ensinamentos, especialmente ao Filipe Marques Gonçalves e a Tanara Vieira Peres pelas ajudas constantes na bancada para realização dos experimentos relacionados à tese.

Aos professores da Pós-Graduação em Neurociências da UFSC pelos ensinamentos, disponibilidade e dedicação nas disciplinas ministradas.

Ao Nivaldo, secretário da Pós-Graduação em Neurociências da UFSC, pela dedicação e profissionalismo. Muito obrigada por me ajudar em todas as questões burocráticas durante este período.

A CAPES, pela bolsa de estudos durante todo o período do doutorado.

Ao programa PRONEX – FAPESC/CNPq pelo financiamento de reagentes e materiais de consumo utilizados nos experimentos.

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.” (Charles Chaplin)

RESUMO

A epileptogênese é um processo que envolve a sinalização celular e a neuroplasticidade. As proteínas cinases ativadas por mitógenos, MAPKs (subfamílias ERK1/2, JNK1/2 e p38^{MAPK}), a fosfatidil-inositol 3-cinase (PI3K)/Akt (PKB ou Akt) e a glicogênio sintase cinase-3β (GSK-3β) regulam uma variedade de eventos intracelulares envolvidos na diferenciação, sobrevivência e morte celular e na plasticidade sináptica. Nós quantificamos através de western blotting, os níveis de MAPKs (ERK1/2, JNK1/2 e p38^{MAPK}), Akt e GSK-3β totais e fosforiladas no neocórtex e no hipocampo de camundongos Swiss machos, 48 h após a última injeção do modelo de *kindling* por pentilenotetrazol (PTZ, 35 mg/kg, i.p., em dias alternados, total de 8 injeções). Os níveis totais das proteínas cinases nas estruturas estudadas não foram afetados pelo *kindling* por PTZ. Os níveis de MAPKs fosforiladas permaneceram inalterados nos animais que não apresentaram crises convulsivas. Os níveis de JNK2 fosforilada, mas não de JNK1 fosforilada, aumentaram no hipocampo dos animais que apresentaram poucos dias com crise convulsiva (1 a 3 dias), e permaneceram semelhantes aos controles nos animais que apresentaram mais de três dias com crise convulsiva. Os níveis de ERK1/2 fosforiladas diminuíram no neocórtex e aumentaram no hipocampo de animais com 1 a 4 dias com crise convulsiva, e permaneceram inalterados nos animais que tiveram mais de 4 dias com crise convulsiva. Já a GSK-3β teve os seus níveis de fosforilação aumentados no neocórtex, mas não no hipocampo, nos animais que tiveram de 0 a 3 dias com crise convulsiva, caindo drasticamente para níveis inferiores ao controle nos animais que apresentaram 4 ou mais dias com crise convulsiva. Uma regressão linear múltipla mostrou que 85% da variação na progressão do *kindling* por PTZ foi explicada pela latência para a ocorrência da crise no primeiro e no último dia de estimulação e pelos níveis de GSK-3β fosforilada no neocórtex. A análise também mostrou que 87% da variação na latência para a ocorrência da última crise convulsiva é explicada pela latência para a ocorrência da primeira crise convulsiva, progressão do *kindling*, níveis de GSK-3β fosforilada no neocórtex e de Akt fosforilada no hipocampo. Utilizando apenas os animais que evoluíram para o *kindling* evidenciou-se que os níveis de ERK1 fosforilada, JNK2 fosforilada, JNK1 total e JNK1 fosforilada no hipocampo estiveram independentemente associados negativa ou positivamente ao número de dias com crise convulsiva. No mesmo

grupo de animais, apenas o nível de p38^{MAPK} fosforilada no neocórtex esteve associado, positivamente, à latência para a ocorrência da crise convulsiva na última estimulação com PTZ. Os resultados do presente estudo sugerem uma dissociação entre os níveis cerebrais regionais de MAPKs, GSK-3 β e Akt associados à epileptogênese (progressão do *kindling*) e ao limiar (latência) para a ocorrência da crise convulsiva em animais sensibilizados pelo PTZ. Esta dissociação pode contribuir para o entendimento da ausência de efeito anti-epileptogênico clinicamente relevante dos fármacos utilizados para o controle das crises epiléticas.

Palavras-chave: Epilepsia, *kindling*, PTZ, biomarcadores, MAPKs, Akt, GSK-3 β .

ABSTRACT

Epileptogenesis is a process that involves neuroplasticity and cellular signaling. The mitogen-activated protein kinases, MAPKs (subfamilies ERK1/2, JNK1/2, and p38^{MAPK}), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt (PKB or Akt) and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) regulate a variety of intracellular events involved in the cell differentiation, survival and death and synaptic plasticity. Herein we quantified by Western blotting the phosphorylation and total levels of MAPKs (ERK1/2, JNK1/2, and p38^{MAPK}), Akt and GSK-3 β in the neocortex and hippocampus from male Swiss mice, 48 hours after the last injection of the kindling pentylenetetrazol procedure (PTZ, 35 mg/kg, i.p., on alternate days, in a total of 8 injections). The total levels of such protein kinases in the investigated structures were not altered by PTZ kindling. The total levels of MAPKs were unchanged in animals that did not develop convulsive seizures. The levels of JNK2 phosphorylation, but not JNK1 phosphorylation, increased in the hippocampus of animals with fewer days with convulsive seizures (1-3 days), and remained similar to controls in animals that had more than three days with convulsive seizures. The levels of ERK1/2 phosphorylation decreased in the neocortex and increased in the hippocampus of animals with 1 to 4 days with convulsive seizures and remained unchanged in animals that had more than 4 days with convulsive seizures. The phosphorylation levels of GSK-3 β was increased in the neocortex, but not in the hippocampus, in animals with 0-3 days with convulsive seizures, and reduced drastically in animals with 4 or more days with convulsive seizures. A multiple linear regression analysis showed that 85% of the kindling progression variance is explained by the latencies for the first and the last days with convulsive seizures and the neocortical levels of GSK-3 β phosphorylation. This analysis also showed that 87% of the variance in the latency for the last day with convulsive seizure is explained by the latency for the first days with convulsive seizure, kindling progression, neocortical GSK-3 β phosphorylation and hippocampal Akt phosphorylation. Analyzing only the animals that developed *kindling*, we showed that the levels of total ERK1, total JNK1, ERK1 phosphorylation and JNK1 phosphorylation in the hippocampus were independently associated with the number of days with convulsive seizures. In the same group of animals, only the level of p38^{MAPK} phosphorylation in the neocortex was positively or negatively associated

with the latency to the occurrence of convulsive seizure in the last stimulation day with PTZ. These findings suggest dissociation between the MAPKs, GSK-3 β and Akt regional brain levels and the seizure threshold and kindling progression in mice. These results may contribute to explain the absence of clinically relevant anti-epileptogenic effects of drugs currently used to treat seizures.

Keywords: Epilepsy, kindling, pentylentetrazole, biomarkers, MAPKs, Akt and GSK-3 β

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Figura esquemática demonstrando uma associação entre as hipóteses de “rede neuronal epiléptica” (brotamento e projeção de axônios entre os neurônios excitatórios) e neurônio epiléptico.....	27
Figura 2: Demonstração esquemática do papel dos interneurônios inibitórios na sincronização.....	28
Figura 3: Representação esquemática das principais MAPKs....	34
Figura 4: Representação esquemática da via de sinalização da Akt e da GSK-3 β	35
Figura 5: Desenho experimental utilizado neste estudo.	42
Figura 6: Esquema ilustrativo da progressão do <i>kindling</i> por PTZ e latência para última crise.	44
Figura 7: Níveis de fosforilação de ERK1/2 em camundongos submetidos ao <i>kindling</i> por PTZ.	51
Figura 8: Níveis de fosforilação de JNK1/2 em camundongos submetidos ao <i>kindling</i> por PTZ.	52
Figura 9: Níveis de fosforilação de p38 ^{MAPK} em camundongos submetidos ao <i>kindling</i> por PTZ.	53
Figura 10: Níveis de fosforilação de ERK1/2 em camundongos submetidos ao modelo de dose única de PTZ.	54
Figura 11: Níveis de fosforilação de JNK1/2 em camundongos submetidos ao modelo de dose única de PTZ.	55
Figura 12: Níveis de fosforilação de p38 ^{MAPK} em camundongos submetidos ao modelo de dose única de PTZ.	56
Figura 13: Níveis de fosforilação de Akt em camundongos submetidos ao <i>kindling</i> por PTZ.	65
Figura 14: Níveis de fosforilação de GSK-3 β em camundongos submetidos ao <i>kindling</i> por PTZ.	66
Figura 15: Níveis de fosforilação de Akt em camundongos submetidos ao modelo de dose única de PTZ.	67
Figura 16: Níveis de fosforilação de GSK-3 β em camundongos submetidos ao modelo de dose única de PTZ.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estágios da evolução comportamental do <i>kindling</i> de acordo com a escala de Racine.....	43
Tabela 2: Perfil geral da avaliação comportamental e da latência para o primeiro e último dias com crise convulsiva dos animais submetidos ao modelo do <i>kindling</i> por PTZ.....	45
Tabela 3: Distribuição dos animais em grupos de acordo com a gravidade de progressão do <i>kindling</i> por PTZ.....	46
Tabela 4: Análise por regressão logística linear das variáveis neuroquímicas e comportamentais associadas à progressão do <i>kindling</i> por PTZ	59
Tabela 5: Análise por regressão logística linear das variáveis neuroquímicas e comportamentais associadas à latência para o último dia com crise convulsiva no modelo de <i>kindling</i> por PTZ	61
Tabela 6: Análise por regressão logística linear das variáveis neuroquímicas e comportamentais associadas à progressão do <i>kindling</i> por PTZ	71
Tabela 7: Análise por regressão logística linear das variáveis neuroquímicas e comportamentais associadas à latência para o último dia com crise convulsiva no modelo de <i>kindling</i> por PTZ	72
Tabela 8: Análise por regressão logística linear dos níveis de GSK-3 β fosforilada com os níveis de Akt total e fosforilada e de GSK-3 β total no neocórtex de animais submetidos ao modelo do <i>kindling</i> por PTZ.....	73
Tabela 9: Resumo dos resultados das avaliações neuroquímicas (MAPKs, ERK1/2, JNK1/2/3 e p38 ^{MAPK}) no modelo do <i>kindling</i> por PTZ estratificados de acordo com o número de dias com crise convulsiva.	74
Tabela 10: Resumo dos resultados das associações independentes das variáveis neuroquímicas (MAPKs) e comportamentais (latências para o primeiro e último dia com crise convulsiva) e a progressão do <i>kindling</i> por PTZ e a latência para o último dia com crise convulsiva..	75
Tabela 11: Resumo dos resultados das associações independentes das variáveis neuroquímicas (Akt e GSK-3 β) e comportamentais (latências para o primeiro e último dia com crise convulsiva) e a progressão do <i>kindling</i> por PTZ e a latência para o último dia com crise convulsiva	75
Tabela 12: Resumo dos resultados das associações independentes das variáveis neuroquímicas (Akt total e fosforilada e GSK-3 β total) e a	

GSK-3 β fosforilada no neocórtex dos animais submetidos ao modelo do <i>kindling</i> por PTZ.....	76
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	proteína cinase B (PKB)
AMPC	monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	análise de variância
ASK	cinase reguladora de sinais de apoptose
Bad	promotor de morte associado à Bcl-2
BDNF	fator neurotrófico derivado do encéfalo
CaMKII	proteína cinase Ca^{2+} /calmodulina-dependente II
Cont	grupo controle
CREB	proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPC
D2R	receptor para dopamina do tipo D2
DO	densidade óptica
Dvl	proteínas Dishevelled
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EI	estímulo inicial
eIF2B	fator de iniciação eucariótica 2B
E.P.M	erro padrão da média
ERK1/2	cinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2
GABA	ácido gama aminobutírico
GDNF	fator neurotrófico derivado da glia
GLU	glutamato
GSK-3	glicogênio sintase cinase 3
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina tipo-1
IKK	inibidor de kappa B cinase
JNK1/2/3	c-Jun NH2-terminal cinases 1, 2 e 3
LTP	potenciação de longa duração
MAPK	proteínas cinases ativadas por mitógenos
MEK	cinase da proteína cinase ativada por mitógeno
MEKK	cinase ativadora de MAPK cinase
MKK	MAPK cinase
MLK	cinase de linhagem mista
NGF	fator de crescimento do nervo
NMDA	N-metil D-Aspartato
p38 ^{MAPK}	proteínas cinases ativadas por mitógenos de 38 kDa
PDK	cinase dependente de fosfatinosítdeo
PEPS	potencial excitatório pós-sináptico
PI3K	fosfatidilinositol 3-cinase
PIP2	fosfatidilinositol (3,4)-bifosfato

PIP3	fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato
PKA	proteína cinase dependente de AMPc
PKC	proteína cinase C
PTEN	homólogo de fosfatase e angiotensina
PTZ	pentilenotetrazol
RNA	ácido ribonucleico
S0	grupo resistente ao <i>kindling</i> por PTZ (nenhum dia com crise convulsiva)
S1,3	grupo que apresentou de 1 a 3 dias com crise convulsiva
S4	grupo que apresentou 4 dias com crise convulsiva
S5	grupo que apresentou 5 dias com crise convulsiva
S6,7	grupo que apresentou de 6 e 7 dias com crise convulsiva
SAPKS	proteínas cinases ativadas por estresse celular
SDS	dodecil sulfato de sódio
SE	segundo estímulo
SNC	sistema nervoso central
THIP	4,5,6,7-terahidroxiisoxazol-[4,5,c]-piridino-3-ol
Tris	tris (hidroximetil) aminometano

PUBLICAÇÕES RELACIONADAS À TESE

Ben J, Marques Gonçalves F, Alexandre Oliveira P, Vieira Peres T, Hohl A, Baily Leal R, Abrão Cavalheiro E, Daniel Schroder Prediger R, Walz R. Brain MAPKs levels are differentially associated with seizures threshold and severity progression in pentylentetrazole-kindled mice. CNS Neurosci Ther. 2013 Sep;19(9):726-9.

Ben J, de Oliveira PA, Gonçalves FM, Peres TV, Matheus FC, Leal RB, Walz R, Prediger RD. Effects of pentylentetrazole kindling on mitogen activated protein kinases (MAPKs) levels in neocortex and hippocampus of mice - ARTIGO SUBMETIDO à Neuroscience.

Moretti M, Matheus FC, de Oliveira PA, Neis VB, **Ben J**, Walz R, Rodrigues ALS, Prediger RD. Role of agmatine in neurodegenerative disease and epilepsy. Frontiers in Bioscience 2014 (no prelo).

OUTRAS PUBLICAÇÕES DURANTE O PERÍODO

Vecchia DD, Schamne MG, Ferro MM, Olszewski J, Sobrera GC, Santos AF, Plodek CK, Latyki CL, Vieira DL, Ben J, Prediger RDS, Miyoshi E. Hypericum perforatum effects on turning behavior in an animal model of parkinson's disease. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 2014 (no prelo).

Gonçalves FM, Freitas AE, Peres TV, Rieger DK, **Ben J**, Maestri M, Costa AP, Tramontina AC, Gonçalves CA, Rodrigues AL, Nagano CS, Teixeira EH, Nascimento KS, Cavada BS, Leal RB. Vatairea macrocarpa lectin (VML) induces depressive-like behavior and expression of neuroinflammatory markers in mice. Neurochem Res. 2013 Nov;38(11):2375-84. doi: 10.1007/s11064-013-1150-9. Epub 2013 Sep 12.

Cechetti F, Pagnussat AS, Worm PV, Elsner VR, **Ben J**, da Costa MS, Mestriner R, Weis SN, Netto CA. Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. Brain Res Bull. 2012 Jan 4;87(1):109-16.

Cechetti F, Worm PV, Elsner VR, Bertoldi K, Sanches E, **Ben J**, Siqueira IR, Netto CA. Forced treadmill exercise prevents oxidative

stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. Neurobiol Learn Mem. 2012 Jan;97(1):90-6.

Ilha J, Centenaro LA, Broetto Cunha N, de Souza DF, Jaeger M, do Nascimento PS, Kolling J, **Ben J**, Marcuzzo S, Wyse AT, Gottfried C, Achaval M. The beneficial effects of treadmill step training on activity-dependent synaptic and cellular plasticity markers after complete spinal cord injury. Neurochem Res. 2011 Jun;36(6):1046-55.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	25
1.1.	DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DAS EPILEPSIAS.....	25
1.2.	EPILEPTOGÊNESE E ICTOGÊNESE.....	25
1.3.	CLASSIFICAÇÃO DAS EPILEPSIAS	28
1.4.	CLASSIFICAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS E TRATAMENTO FARMACOLÓGICO ATUAL	29
1.5.	MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDOS EM EPILEPTOLOGIA.....	31
1.6.	MOLÉCULAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR COMO BIOMARCADORES DE EPILEPSIA	32
1.7.	JUSTIFICATIVA	37
2.	OBJETIVOS	39
2.1.	OBJETIVO GERAL	39
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
	<i>Capítulo I - Níveis de MAPKs no modelo do kindling induzido por pentilenotetrazol.....</i>	<i>39</i>
	<i>Capítulo II - MAPKs, latência para crise e progressão do kindling induzido por pentilenotetrazol.....</i>	<i>39</i>
	<i>Capítulo III - Níveis de Akt e de GSK-3β no modelo do kindling induzido por pentilenotetrazol.....</i>	<i>40</i>
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1.	ANIMAIS.....	41
3.2.	REAGENTES.....	41
3.3.	MODELOS EXPERIMENTAIS.....	41
3.4.	WESTERN BLOTTING.....	45
3.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
4.	RESULTADOS.....	49
4.1.	CAPÍTULO I - NÍVEIS DE MAPKS NO MODELO DO <i>KINDLING</i> INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL	49
4.2.	CAPÍTULO II - MAPKS, LATÊNCIA PARA CRISE E PROGRESSÃO DO <i>KINDLING</i> INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL	57
4.3.	CAPÍTULO III - NÍVEIS DE AKT E DE GSK-3 β NO MODELO DO <i>KINDLING</i> INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL	63
4.4.	RESUMO DOS RESULTADOS	74

5.	DISCUSSÃO.....	77
6.	SUMÁRIO DOS RESULTADOS	87
7.	CONCLUSÕES	89
8.	ANEXO 1 – ARTIGO SUBMETIDO.....	91
9.	ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO	113
10.	REFERÊNCIAS.....	117

1. INTRODUÇÃO

1.1. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DAS EPILEPSIAS

As epilepsias são um grupo de condições neurológicas crônicas caracterizadas pela ocorrência de crises epiléticas espontâneas e recorrentes. Crises epiléticas são manifestações clínicas transitórias resultantes da atividade neuronal excessiva, hipsincrônica e anormal de neurônios localizados predominantemente no neocórtex (Engel, 1989, 1996; Mulley *et al.*, 2005). A incidência de epilepsia varia muito de acordo com a idade, sexo, raça, tipo de síndrome epilética e condição socioeconômica causando um impacto mundial sobre os custos da saúde semelhante ao câncer de mama em mulheres e de pulmão em homens (Kale, 1997).

Estima-se que em países desenvolvidos até 5% da população apresentará ao menos uma crise epilética ao longo da vida e 0,5% da população apresenta crises recorrentes (Hauser, 1997). No Brasil, assim como em outros países em desenvolvimento, apesar dos estudos epidemiológicos serem escassos, estima-se que o número de casos de epilepsia seja possivelmente ainda maior, considerando os fatores de risco ambientais aumentados como traumatismos, infecções, carência de acompanhamento pré-natal, entre outros (Hauser, 1997). Segundo a Liga Internacional de Combate à Epilepsia, são considerados refratários ao tratamento farmacológico os pacientes com epilepsia que não obtenham o controle das crises epiléticas após o tratamento adequado com 2 fármacos anti-epiléticos. Segundo este critério, em torno de 1/3 dos pacientes com epilepsia são refratários ao tratamento farmacológico (Kwan *et al.*, 2010). Estas estimativas apontam para epilepsia como um problema de saúde pública que necessita da estruturação de programas de atuação em diferentes níveis, desde os cuidados primários até centros mais especializados de atendimento terciário e de pesquisa científica.

1.2. EPILEPTOGÊNESE E ICTOGÊNESE

O termo epileptogênese se refere ao processo de instalação da condição epilética no cérebro, caracterizado por modificações na fisiologia intrínseca de neurônios e células gliais associadas à reorganização da rede neuronal. O tempo decorrente para instalação completa da epileptogênese após um estímulo específico é variável e em muitos casos é difícil de ser estimado. Muitas vezes não existe relato

específico de lesão cerebral associada e a epileptogênese parece se desenvolver devido a fatores quase que exclusivamente genéticos, impossibilitando a identificação do ponto do início do processo de epileptogênese. É bem aceito que a epileptogênese seja um processo multifatorial decorrente de uma interação variável entre os fatores ambientais e genéticos envolvidos (Risch & Merikangas, 1996; Todd, 1999; Walz *et al.*, 2002; Mulley *et al.*, 2005).

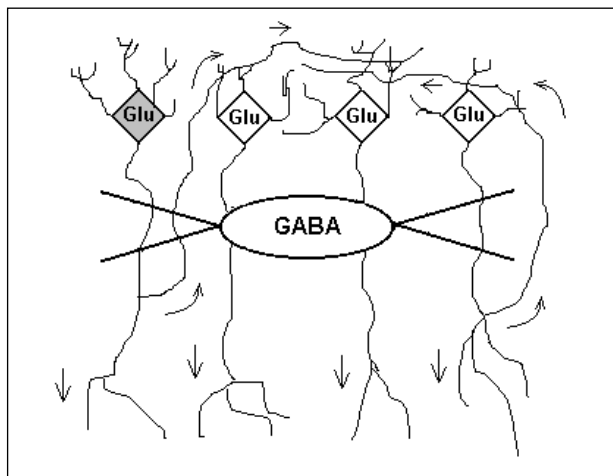
A epileptogênese provavelmente possui características próprias dependendo do tipo e da gravidade do insulto que desencadeou o processo, da região cerebral afetada, das células envolvidas e da predisposição genética. Estudos epidemiológicos indicam que a epilepsia pode se desenvolver em até 50% dos casos de traumatismo craniano (Salazar *et al.*, 1985), 10% dos casos de acidente vascular cerebral (Ferro *et al.*, 2003; Lossius *et al.*, 2005) e 7% das infecções do sistema nervoso central (SNC) (Annegers *et al.*, 1988).

A ictogênese se refere ao início de uma crise epiléptica propriamente dita, estando relacionada ao desequilíbrio entre os mecanismos que facilitam o disparo neuronal normal e os mecanismos de controle que protegem os neurônios de descargas excessivas de potenciais de ação (Scharfman, 2007). A resposta de um neurônio a um determinado estímulo depende das características deste estímulo, da sua fisiologia intrínseca e da sua interação com a rede neural envolvida (Llinas, 1988; Connors & Gutnick, 1990).

A fisiologia intrínseca dos neurônios depende das propriedades de sua membrana celular (canais iônicos) e metabólicas (bombas iônicas, mensageiros intracelulares, proteínas cinases, proteínas fosfatases e aporte energético). Os neurônios também podem interagir com outras células neuronais e gliais através de uma sinalização intercelular dependente de neurotransmissores e fatores neurotróficos (Papura *et al.*, 1994; Porter & McCarthy, 1996). Nas descargas epilépticas ocorrem atividades neurais excessivas, anormais e hipersíncronas de neurônios (Engel, 1989, 1996; Mulley *et al.*, 2005), como demonstrado na Figura 1.

Alguns estudos sugerem que pacientes com epilepsia possuem um desequilíbrio causado pela hiperexcitabilidade neuronal associado em parte a alterações nos sistemas de neurotransmissão, como o comprometimento da transmissão inibitória (mediada por GABA), e/ou estimulação da transmissão excitatória (glutamatérgica) (Dichter & Ayala, 1987; Meldrum *et al.*, 1999; Coulter, 2001).

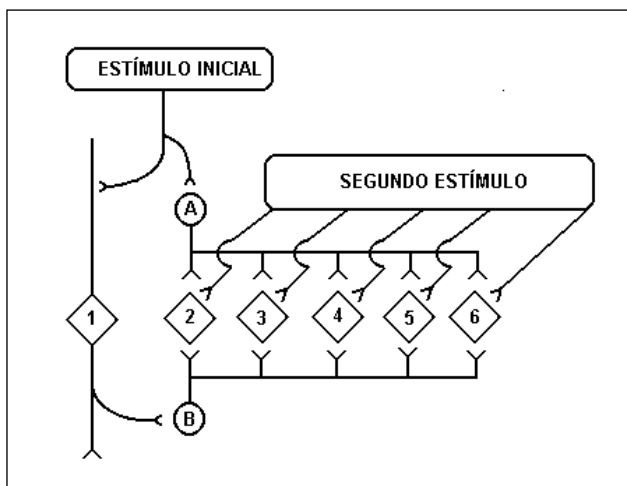
Figura 1: Figura esquemática demonstrando uma associação entre as hipóteses de “rede neuronal epiléptica” (brotamento e projeção de axônios entre os neurônios excitatórios) e neurônio epiléptico.



O “neurônio epiléptico”, representado em cinza, é uma “spontaneous bursting cell” (neurônios que despolarizam espontaneamente), que conectado aos demais pode acarretar uma despolarização espontânea. Os neurônios inibitórios estão representados na figura por um único neurônio GABAérgico, que é responsável pela sincronização das demais células produtoras de glutamato (Glu). Não estão representados na figura os brotamentos de neurônios inibitórios (modificado de Walz et al., 2011).

A sincronia neural é a despolarização simultânea de um grupo de neurônios e para que isso ocorra todos os neurônios devem estar simultaneamente repolarizados em um determinado momento (Figura 2). Nesse processo, os interneurônios inibitórios GABAérgicos (GABA: ácido gama aminobutírico) são fundamentais para que ocorra a sincronização neuronal, pois ao inibirem simultaneamente um conjunto de neurônios, tornam estes aptos para serem excitados de forma sincrônica por neurotransmissores excitatórios, como o glutamato. Além disso, os mecanismos inibitórios também estão envolvidos no término das crises epilépticas, onde sua ativação associada a particularidades anatômicas e fisiológicas regionais impedem a sincronização e recrutamento e/ou promovem a dessincronização (Engel, 1989).

Figura 2: Demonstração esquemática do papel dos interneurônios inibitórios na sincronização.



O estímulo inicial (EI) causa o potencial excitatório pós-sináptico (PEPS) em um neurônio piramidal (1), promovendo a inibição de outros neurônios piramidais (2 a 6), originalmente não envolvidos com o EI, por meio de mecanismos do tipo *feed-forward* (A) e *feedback* (B). Caso o segundo estímulo (SE) excitatório ocorra em frequência adequada, poderá atingir os neurônios piramidais fora do período refratário (repolarizados), desencadeando uma resposta hipersíncrona (modificado de Walz et al., 2011)

1.3. CLASSIFICAÇÃO DAS EPILEPSIAS

De acordo com a etiologia, as epilepsias podem ser classificadas como sendo associadas a condições estruturais ou metabólicas, genéticas ou de causas desconhecidas (Berg *et al.*, 2010).

As epilepsias associadas a condições estruturais ou metabólicas são aquelas em que é possível estabelecer com certa precisão uma causa de natureza estrutural ou metabólica para o desenvolvimento da epileptogênese. Como por exemplo, um tumor cerebral ou um traumatismo craniano podem acarretar crises epiléticas recorrentes em pacientes com propensão para a epileptogênese (Berg *et al.*, 2010).

As epilepsias de causa desconhecida correspondem a aproximadamente um terço dos casos de epilepsia e cujos mecanismos envolvidos são pouco compreendidos. Dessa forma, essa categoria

necessita de intensa pesquisa na área de neuroimagem e genética para que em um futuro próximo possam ser identificados os principais fatores e mecanismos envolvidos (Berg *et al.*, 2010).

Considerando as características clínicas, demográficas, eletrofisiológicas, de neuroimagem e de prognóstico, várias epilepsias podem ser agrupadas nas chamadas síndromes eletroclínicas, organizadas por idade de início: período neonatal, primeira infância, segunda infância, adolescente ou adulto e idade variável de início (Berg *et al.*, 2010).

1.4. CLASSIFICAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS E TRATAMENTO FARMACOLÓGICO ATUAL

A crise epilética é a manifestação clínica resultante da atividade neuronal excessiva, hipersincrônica e anormal de neurônios localizados predominantemente no neocórtex, sendo esta manifestação transitória (Engel, 1989, 1996; Mulley *et al.*, 2005). Esta manifestação varia de acordo com as regiões do neocórtex e subcorticais envolvidas pela atividade elétrica cerebral anormal, podendo se manifestar através de sinais ou de sintomas motores, sensoriais e com comprometimento variável da consciência. De acordo com sua manifestação clínica e eletroencefalográfica, as crises epiléticas são classificadas em crises epiléticas generalizadas, focais e não classificadas (Berg *et al.*, 2010).

As crises epiléticas focais originam-se de estruturas do neocórtex ou subcorticais em uma região delimitada a um hemisfério cerebral, podendo ser discretamente localizada ou distribuída mais amplamente. As crises epiléticas em geral se manifestam a partir de uma mesma região inicial, embora existam casos de pacientes com mais de uma região cerebral afetada e mais de um tipo de crise (epilepsias multifocais) (Berg *et al.*, 2010). Crises de início focal podem propagar-se para ambos os hemisférios acarretando uma generalização secundária.

As crises epiléticas primariamente generalizadas parecem se originar em uma determinada região cortical, evoluindo com rápida propagação para estruturas sub-corticais como o tálamo e do tronco cerebral determinando uma propagação rápida e bilateral, imperceptível ao paciente ou examinador, resultando em alterações eletroencefalográficas de superfície visíveis em ambos os hemisférios cerebrais. Algumas crises generalizadas que ocorrem em síndromes epiléticas do tipo epilepsia de ausência ou epilepsia mioclônica apresentam mecanismos peculiares de sincronização tálamo-cortical envolvendo um padrão eletrográfico do tipo generalizado bastante

específico (ponta seguida de onda-lenta a 3 Hz ou polipontas). Tem sido descrito que tais epilepsias (de ausências e mioclônicas) têm seu início focal, imperceptível, com rápida propagação para o tálamo, embora não seja descartada a possibilidade de um mecanismo primariamente originado no tálamo (Snead, 1995).

As crises epiléticas que não preenchem os critérios para a classificação generalizada ou focal são consideradas não classificadas como, por exemplo, os espasmos epiléticos (Berg *et al.*, 2010).

As drogas antiepiléticas não apresentam efeito anti-epileptogênico clinicamente relevante, atuando basicamente no controle das crises epiléticas (Walker *et al.*, 2002). Além disso, apesar da introdução de 15 fármacos antiepiléticos de terceira geração, 20 a 30 % dos pacientes continuam a apresentar crises (Löscher *et al.*, 2013). Estes fármacos atuam principalmente em canais de sódio voltagem-dependente, diminuindo o influxo de sódio na célula (fenitoína, carbamazepina, ácido valpróico, oxcarbazepina, valproato e lamotrigina); modulando receptores GABA_A, favorecendo a entrada de ânions cloreto nos neurônios (fenobarbital e benzodiazepínicos); em canais de cálcio, diminuindo o influxo deste íon nos neurônios (gabapentina, etosuximida) (Macdonald, 1997). Algumas drogas possuem como alvo os receptores de glutamato, mas estas drogas também atuam inibindo as correntes de sódio (topiramato) (Macdonald, 1997). Portanto, embora indiretamente os fármacos utilizados atualmente possam modificar os níveis intracelulares de moléculas de sinalização celular, este efeito não parece modificar significativamente os mecanismos de neuroplasticidade envolvidos na epileptogênese (Walker *et al.*, 2002; Kwan *et al.*, 2010).

Com exceção das epilepsias generalizadas primárias nas quais o tratamento de escolha é com ácido valpróico ou lamotrigina, para todas as demais síndromes, cujas crises são de início focal, não se observou vantagens no uso de um fármaco específico (Glauser *et al.*, 2006, 2013). Para epilepsias focais, embora apresentem mecanismos distintos, atualmente se aceita que os fármacos disponíveis no mercado (fenobarbital, fenitoína, carbamazepina, oxcarbazepina, ácido valpróico, divalproato de sódio, gabapentina, topiramato, lamotrigina, leviracetam, tiagabina, vagabatrina) apresentam uma eficácia semelhante no controle das crises epiléticas, havendo apenas variações na tolerância e esquemas posológicos (Wilby *et al.*, 2005).

1.5. MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDOS EM EPILEPTOLOGIA

Os modelos animais de epilepsia e crise epiléptica são muito utilizados para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento das epilepsias, bem como para o entendimento dos processos envolvidos na epileptogênese e ictogênese (Janz, 1985; Walker *et al.*, 2002). As crises epilépticas estudadas em modelos experimentais podem ser induzidas quimicamente ou eletricamente, ou ocorrerem de forma espontânea como no caso de animais geneticamente propensos, ou submetidos à manipulação experimental. Estes últimos passam a apresentar crises espontâneas após a indução de modificações estruturais e funcionais como, por exemplo, no modelo da pilocarpina (Cavalheiro *et al.*, 1996) ou ácido caínico (Mathern *et al.*, 1993). Tais modelos auxiliam no entendimento de epilepsias decorrentes de insultos precipitantes, como é o caso da epilepsia de lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo.

No caso dos modelos de animais geneticamente propensos a apresentar crises epilépticas espontâneas (*Babuño Papio Papio*, os *Ratos Geneticamente Suscetíveis à Epilepsia*, os *Ratos de Strasbourg* e os *Ratos Espontaneamente Epilépticos*), estes auxiliam no entendimento de distúrbios herdados cuja repercussão anatômica ou funcional sobre a rede neural acarreta crises epilépticas (Noebels *et al.*, 1997).

Os modelos animais de epilepsia agudos consistem de crises epilépticas únicas induzidas por fármacos ou por aplicação de corrente elétrica. Nos modelos agudos de crise focal, pode ser utilizada a estimulação elétrica e a aplicação focal de pró-convulsivantes farmacológicos como agonistas de aminoácidos excitatórios ou antagonistas de aminoácidos inibitórios (Avanzini *et al.*, 1997). Nos modelos agudos de crise generalizada do tipo convulsiva as crises podem ser induzidas através do eletrochoque ou farmacologicamente através da administração sistêmica de doses elevadas de pentilenotetrazol (PTZ) (60 - 70 mg/kg). Já as crises generalizadas do tipo ausência podem ser induzidas através da administração sistêmica de penicilina em felinos, baixas doses de PTZ (10 - 20 mg/kg) ou do agonista GABAérgico THIP (4,5,6,7-terahidroxiisoxazol-[4,5,c]-piridino-3-ol) em roedores (Mody & Schwartzkroin, 1997).

Os modelos crônicos de epilepsia são caracterizados pela recorrência de crises espontâneas após injeção localizada em regiões do neocórtex ou subcorticais de compostos como o alumínio, a toxina tetânica, o ácido caínico e a pilocarpina, e após injeção sistêmica de

ácido caínico ou pilocarpina. Estes modelos apresentam uma maior semelhança com a realidade clínica das epilepsias (Mathern *et al.*, 1993; Cavalheiro *et al.*, 1996). O modelo do *kindling* não apresenta crises espontâneas, mas promove modificações plásticas duradouras no SNC, sendo considerado um modelo crônico de epilepsia (McNamara & Wada, 1997).

A palavra “*kindling*” significa abrasamento e o modelo animal de epilepsia por *kindling* é realizado através da aplicação de estímulos sub-convulsivantes químicos (PTZ ou picrotoxina) ou elétricos que resultam em crises epiléticas progressivamente mais intensas ao longo de subseqüentes estimulações (Racine *et al.*, 1972; McNamara & Wada, 1997). Os animais são avaliados de acordo com a escala de Racine (Racine, 1972a, 1972b; Racine *et al.*, 1972), que estipulou diferentes estágios de progressão do *kindling*: 1) clônus facial; 2) movimentação de flexão e extensão da cabeça; 3) clônus de patas contralaterais ao hemisfério estimulado; 4) permanência de pé apenas sobre as patas traseiras (*Rearing*); 5) *Rearing* seguido de queda. Uma vez atingido o estágio 5 de Racine, os animais podem permanecer um longo espaço de tempo sem serem estimulados, e uma vez sendo repetido o mesmo estímulo, ele apresenta uma crise de estágio 5.

O PTZ é um inibidor seletivo do ionóforo de cloreto acoplado ao receptor GABA do subtipo A, que se liga ao sítio de interação da picrotoxina, bloqueando o efeito inibitório do receptor, consequentemente promovendo efeitos estimulantes e convulsivantes (Huang *et al.*, 2001). O modelo do *kindling* induzido por PTZ é bastante útil, pois permite estudar crises convulsivas em cérebros hiperexcitáveis e mecanismos de plasticidade neuronal e neuroquímicos envolvidos na ictogênese e epileptogênese (Walz *et al.*, 2011).

1.6. MOLÉCULAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR COMO BIOMARCADORES DE EPILEPSIA

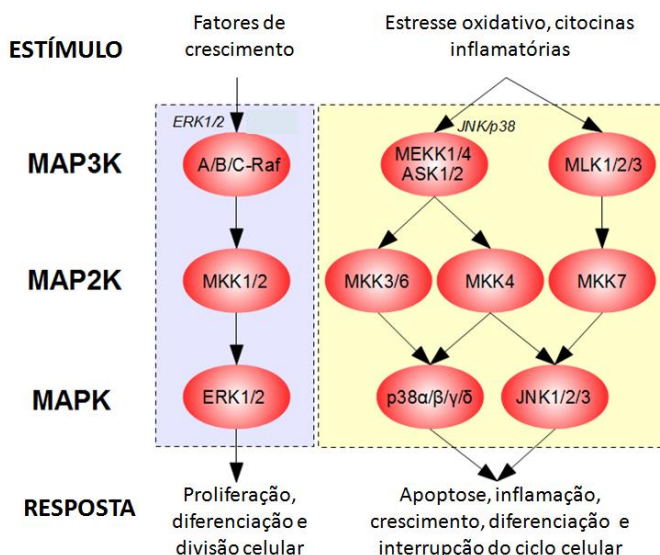
As células do organismo são capazes de responder a sinais extracelulares através de sistemas de sinalização intracelular (Greengard, 2001). Estes sistemas de transdução de sinal envolvem seqüências ordenadas de reações bioquímicas que modulam a atividade de receptores, segundos mensageiros, proteínas cinases, proteínas fosfatases e fatores de transcrição (Greengard, 2001; Thomas & Huganir, 2004). No SNC, estes sistemas estão intimamente relacionados ao funcionamento neuronal e glial como a proliferação, diferenciação e

morte celular, neurogênese e neuroplasticidade (Greengard, 2001; Kandel, 2001; Cohen & Greenberg, 2008). Dentre as principais proteínas cinases envolvidas em vias de sinalização celular no SNC destacam-se as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), a fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K)/AKT (PKB ou Akt), a proteína cinase dependente de AMPc (PKA), a proteína cinase C (PKC) e a proteína cinase Ca^{2+} /calmodulina-dependente II (CaMKII) (Nestler & Greengard, 1984; Sweatt, 2001; Hanada *et al.*, 2004).

Mutações em genes que codificam estas cinases e suas vias de sinalização em geral estão associadas a doenças graves cujas manifestações clínicas não estão relacionadas exclusivamente ao cérebro como é o caso das RASopatias. As RASopatias são doenças genéticas relacionadas à disfunção na via de sinalização RAS-MAPK, cuja enzima efetora final é a ERK1/2, investigada nesta tese. Estas doenças envolvem vários órgãos, e a sintomatologia neurológica não se restringe às crises epiléticas, mas inclui deficiência cognitiva, atraso no desenvolvimento, comportamento autista e sintomas psiquiátricos (Alfieri *et al.*, 2014).

As MAPKs fazem parte da família das serina/treonina cinases e estão amplamente distribuídas no SNC. As principais MAPKs (Figura 3) são as cinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2), as c-Jun NH2-terminal cinases 1, 2 e 3 (JNK1/2/3) e as proteínas cinases ativadas por mitógenos de 38 kDa (p38^{MAPK} α , β , γ e δ) (Chang & Karin, 2001; Chen *et al.*, 2001; Thomas & Huganir, 2004; Waetzig & Herdegen, 2004). As ERKs são ativadas por fatores de crescimento e regulam a expressão gênica, a proliferação, a sobrevivência e a morte celular e a neuroplasticidade (Chen *et al.*, 2001; Thomas & Huganir, 2004; Schenk *et al.*, 2005). As JNKs e as p38^{MAPKs} são proteínas cinases ativadas por estresse celular (SAPKs), associadas ao estresse e à morte celular, mas também participam de processos de desenvolvimento do SNC e de neuroplasticidade (Mielke & Herdegen, 2000; Cowan, 2003; Waetzig & Herdegen, 2004).

Figura 3: Representação esquemática das principais MAPKs.

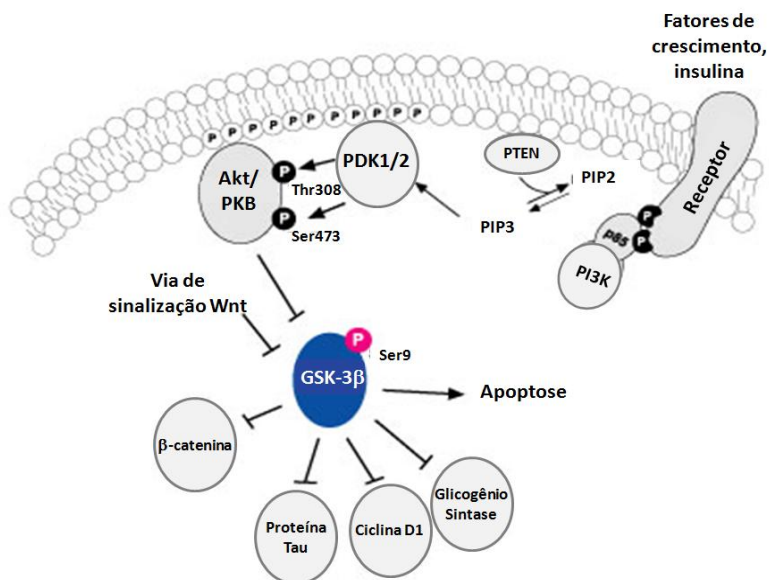


MAP3K: proteína cinase cinase cinase ativada por mitógeno, MAP2K: proteína cinase cinase ativada por mitógeno, MKK: MAPK cinase, MEKK: cinase ativadora de MAPK cinase, ASK: cinase reguladora de sinais de apoptose, MLK: cinase de linhagem mista (adaptada de <http://www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp>)

Outra importante via de sinalização intracelular é a PI3K/AKT (Figura 4), membro da família de proteínas cinases AGC, expressa em diferentes isoformas PKB α (Akt1), PKB β (Akt2) e PKB γ (Akt3), sendo a última a principal isoforma presente no SNC (Datta *et al.*, 1999; Hanada *et al.*, 2004). A PI3K pode ser ativada por vários fatores de crescimento (insulina; fator de crescimento do nervo, NGF; fator neurotrófico derivado do encéfalo, BDNF; fator neurotrófico derivado da glia, GDNF; fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, IGF-1; N-metil D-Aspartato, NMDA), promovendo sua ativação, que por sua vez converte a fosfatidilinositol (3,4)-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3) (Rodgers & Theibert, 2002; Scheid & Woodgett, 2003). A Akt é recrutada para a membrana plasmática pelo PIP2 e PIP3, onde é fosforilada em dois sítios específicos (Scheid & Woodgett, 2003). A ativação (fosforilação)

completa da Akt leva a fosforilação de substratos específicos tanto no citoplasma quanto no núcleo, inativando diversas proteínas pró-apoptóticas (promotor de morte associado à Bcl-2, Bad; caspase 9, glicogênio sintase cinase 3, GSK-3; proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc, CREB; inibidor de kappa B cinase, IKK), promovendo inúmeras funções celulares como regulação do crescimento, proliferação, metabolismo e sobrevivência, bem como na plasticidade sináptica, no aprendizado e na memória (Datta *et al.*, 1999; Brazil *et al.*, 2004; Chong *et al.*, 2005; Hemmings & Restuccia, 2012).

Figura 4: Representação esquemática da via de sinalização da Akt e da GSK-3 β .



PDK: cinase dependente de fosfatinosítídeo; PTEN: homólogo de fosfatase e tensina (adaptado de

<http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/Cell%20Signaling%20Technology/9336.htm>).

A glicogênio sintase cinase-3 (GSK-3) é uma serina/treonina cinase multifuncional constitutivamente ativa, que apresenta duas formas altamente homólogas em mamíferos, a GSK-3 α e a GSK-3 β (Woodgett, 1990; Jope & Johnson, 2004). A GSK-3 β é abundante no SNC, especificamente em neurônios (Leroy & Brion, 1999) e pode ser regulada por inibição através da fosforilação da Ser9 por diversas

cinases, como a Akt, a AGC cinase, a p70 ribossômica S6 cinase, a p90 ribossômica S6 cinase (Dudek, 1997; Frame & Cohen, 2001; Jope & Johnson, 2004). A GSK-3 β atua em diversos substratos como a glicogênio sintase, o fator de iniciação eucariótica 2B (eIF2B), a proteína tau e a proteína β -catenina (Fig. 4) (Frame & Cohen, 2001; Eldar-Finkelman, 2002; Jope & Johnson, 2004), regulando tanto o metabolismo de glicogênio como atuando em diversas funções fisiológicas como apoptose, estabilidade do citoesqueleto e plasticidade sináptica (Yeste-Velasco *et al.*, 2007). Também foi relatada a participação da GSK-3 no transporte e no crescimento axonal através da fosforilação da proteína tau (Zhou, 2005) e que alterações na ativação desta cinase apresenta um importante papel em diversas doenças neurodegenerativas (Bhat *et al.*, 2000; Lei *et al.*, 2011; Mines *et al.*, 2011).

A epileptogênese e a ictogênese podem estar associadas a respostas neuroquímicas imediatas (de segundos até minutos) e tardias (de horas até anos). Os efeitos imediatos das crises epiléticas estão relacionados à liberação de neurotransmissores e sua interação com os seus receptores específicos, podendo ocasionar modificações conformacionais destes receptores, modificações de canais iônicos e produção, liberação, recaptção e degradação de neuromoduladores, e consequentemente podendo promover modificações na atividade de proteínas intracelulares, como a modulação de proteínas cinases e/ou fosfatases através dos sistemas de transdução de sinal. Estas mudanças no metabolismo e sinalização celular podem alterar a transcrição gênica e consequentemente os níveis basais de diferentes proteínas, acarretando modificações funcionais e estruturais duradouras de neurônios e células gliais (Lothman, 1997; Engel *et al.*, 2013).

Biomarcadores são características mensuráveis de processos biológicos normais ou patológicos (Engel *et al.*, 2013). Biomarcadores de epileptogênese ou de ictogênese podem: 1) prever o desenvolvimento da condição epilética, 2) identificar a presença de anormalidades teciduais capazes de gerar crises epiléticas e quantificar sua gravidade, 3) medir a progressão da doença após a condição instalada, 4) ser úteis na criação de modelos animais com melhor custo-efetividade para *screening* de fármacos ou dispositivos anti-epileptogênicos e anti-crise (Engel *et al.*, 2013). Neste sentido, considerando o envolvimento das moléculas de transdução de sinal na neuroplasticidade em doenças neurológicas, é possível que estas

moléculas possam servir de biomarcadores de epileptogênese e ictogênese.

1.7. JUSTIFICATIVA

Para cada tipo de epilepsia, é provável que existam alterações específicas de natureza neuroquímica, histopatológica e de circuitos neurofisiológicos próximos e distantes da zona epileptogênica. Tais peculiaridades podem estar associadas às diferentes características clínicas e neurofisiológicas, aos padrões de propagação das crises epiléticas e às diferentes respostas aos tratamentos farmacológicos.

Ao longo dos anos a indústria farmacêutica desenvolveu diversos fármacos capazes de reduzir parcial ou completamente a ocorrência de crises epiléticas. Mesmo com o avanço significativo no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das epilepsias, aproximadamente 20% dos pacientes apresentam epilepsias refratárias ao tratamento farmacológico. Mesmo utilizando doses adequadas de fármacos estes pacientes continuam a apresentar crises epiléticas numa frequência que compromete significativamente a qualidade de vida (Pauli *et al.*, 2012). Além disso, nenhum dos fármacos desenvolvidos até o momento mostrou-se capaz de impedir o desenvolvimento ou reverter o processo de epileptogênese uma vez este instalado, apresentando apenas um efeito clínico contra a ictogênese com pouco ou nenhum efeito contra a epileptogênese.

O estudo de mecanismos de transdução de sinal na epileptogênese e ictogênese pode ser muito importante para o entendimento desta dissociação no efeito terapêutico dos fármacos utilizados para o tratamento das epilepsias. Compreender as diferenças entre a epileptogênese e a ictogênese pode ser um caminho para o aprimoramento de fármacos capazes de alterar o curso natural da epileptogênese e/ou aumentarem a eficácia de controle de crises epiléticas em casos refratários.

Desta forma, nossa hipótese é que as modificações nos níveis totais e fosforilados de proteínas de sinalização celular, como a ERK1/2, a JNK1/2/3, a p38^{MAPK}, a Akt e a GSK-3 β , no neocórtex e no hipocampo de animais submetidos ao modelo do *kindling* por PTZ, possam servir de biomarcadores para a gravidade de instalação da epileptogênese e para a ictogênese.

Os resultados deste trabalho serão apresentados em três capítulos, cada um representando um artigo científico.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi investigar se a ativação e os níveis das MAPKs, da Akt e da GSK-3 β no neocórtex e no hipocampo podem representar biomarcadores de epileptogênese e ictogênese no modelo animal de epilepsia induzido pelo *kindling* por PTZ em camundongos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo I - Níveis de MAPKs no modelo do kindling induzido por pentilenotetrazol

✓ Avaliar a ativação e os níveis de ERK1/2, de JNK1/2/3 e de p38^{MAPK} no neocórtex e no hipocampo de camundongos machos submetidos ao modelo do *kindling* por PTZ.

✓ Avaliar a ativação e os níveis de ERK1/2, de JNK1/2/3 e de p38^{MAPK} no neocórtex e no hipocampo de camundongos machos submetidos ao modelo do PTZ dose única.

Capítulo II - MAPKs, latência para crise e progressão do kindling induzido por pentilenotetrazol

✓ Avaliar a associação entre a progressão do *kindling* por PTZ, estimada pelo número de dias com crise convulsiva, e os níveis de ERK1/2, de JNK1/2/3 e de p38^{MAPK} totais e fosforiladas no neocórtex e no hipocampo de camundongos machos.

✓ Avaliar a associação entre o limiar para crise convulsiva, estimado pela latência para a ocorrência da crise convulsiva no último dia de estimulação, e os níveis de ERK1/2, de JNK1/2/3 e de p38^{MAPK} totais e fosforiladas no neocórtex e no hipocampo de camundongos sensibilizados pelo *kindling* por PTZ.

Capítulo III - Níveis de Akt e de GSK-3 β no modelo do kindling induzido por pentilenotetrazol

✓ Avaliar a ativação e os níveis de Akt e de GSK-3 β no neocórtex e no hipocampo de camundongos machos submetidos ao modelo do *kindling* por PTZ.

✓ Avaliar a ativação e os níveis de Akt e de GSK-3 β no neocórtex e no hipocampo de camundongos machos submetidos ao modelo do PTZ dose única.

✓ Avaliar a associação entre a progressão do *kindling* por PTZ, estimada pelo número de dias com crise convulsiva, e os níveis de Akt e de GSK-3 β totais e fosforiladas no neocórtex e no hipocampo de camundongos machos.

✓ Avaliar a associação entre o limiar para crise convulsiva, estimado pela latência para a ocorrência da crise convulsiva no último dia de estimulação, e os níveis de Akt e de GSK-3 β totais e fosforiladas no neocórtex e no hipocampo de camundongos sensibilizados pelo *kindling* por PTZ.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss machos adultos, de 10 a 12 semanas de idade, pesando entre 30 e 60 g no início dos experimentos. Os animais foram mantidos em caixas coletivas (15 animais por caixa) e em uma sala com temperatura controlada (23 ± 2 °C), com ciclo claro/escuro de 12 h cada, com livre acesso a comida padrão e água. Todos os procedimentos comportamentais foram realizados entre 9 e 12 horas da manhã, para respeitar um padrão de ritmo circadiano dos animais. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA; protocolo: PP00830) da UFSC e seguiu o “Principles of Laboratory Animal” do NIH.

3.2. REAGENTES

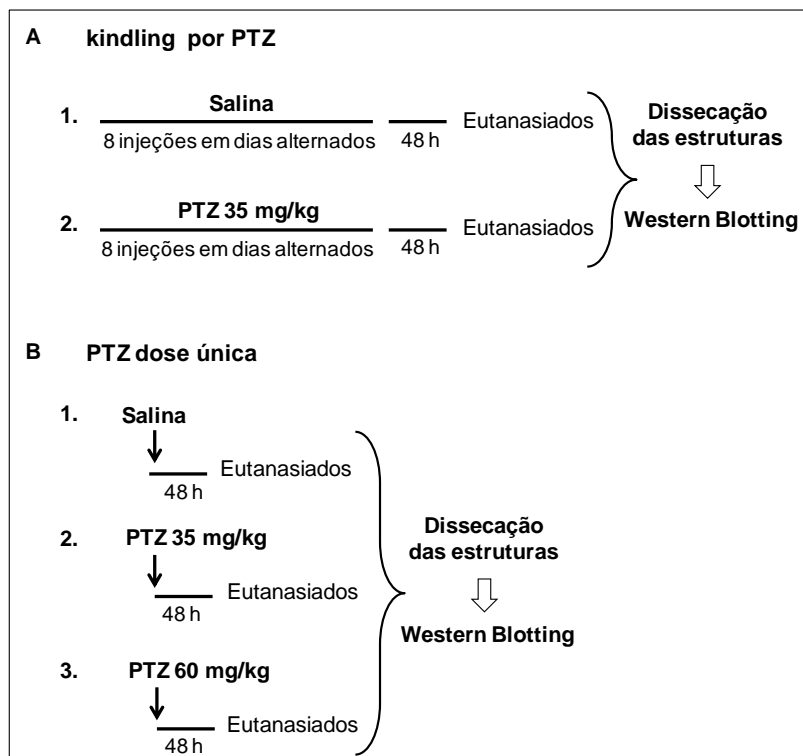
Os anticorpos primários anti-ERK1/2, anti-p38^{MAPK} e anti-JNK1/2 e o PTZ foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Os anticorpos, anti-fosfo-ERK1/2, anti-fosfo-p38^{MAPK}, anti-fosfo-JNK1/2, anti-Akt, anti-fosfo-Akt, anti-GSK-3 β e anti-fosfo-GSK-3 β foram adquiridos da Cell Signaling (Beverly, MA, EUA). Anti- β -actina foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). Acrilamida, bis- acrilamida, β -mercaptoetanol, Hybond[®] nitrocelulose, Amersham Hyperfilm ECL[®], dodecil sulfato de sódio (SDS), Tris, anticorpo secundário (anti-coelho-IgG conjugado à peroxidase) e reagentes de detecção ECL[®] foram obtidos da GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, EUA). Todos os outros reagentes utilizados eram de grau analítico.

3.3. MODELOS EXPERIMENTAIS

Foram empregados dois modelos animais para o estudo da epilepsia, o *kindling* por PTZ (Figura 5A) e o PTZ dose única (Figura 5B). O experimento de PTZ dose única foi realizado para investigar os possíveis efeitos do PTZ e da crise convulsiva *per se* na fosforilação e nos níveis totais de MAPKs, da Akt e da GSK-3 β . Imediatamente após as injeções de PTZ, os animais foram observados comportamentalmente por 30 minutos e a intensidade das crises epiléticas foi categorizada de acordo com a escala de Racine (Tabela 1) para ambos os protocolos

experimentais. Em todos os dias de estimulação por PTZ foram registradas as latências para a ocorrência crise convulsiva (Walz *et al.*, 1999).

Figura 5: Desenho experimental utilizado neste estudo.



A) Experimento do *kindling* por PTZ: os animais receberam 8 injeções intraperitoneais (i.p.) de 35 mg/kg de PTZ (n = 32) ou salina (grupo controle, n = 7) em dias alternados. B) Experimento de PTZ dose única: os animais receberam apenas uma injeção i.p. de PTZ 35 mg/kg (n = 5) ou 60 mg/kg (n = 4) ou salina (controle, n = 4). Em ambos os experimentos, os animais foram observados por 30 minutos após a injeção de PTZ e foram eutanasiados 48 h após a última injeção e o neocórtex e o hipocampo foram dissecados e armazenados no freezer -80 °C, para posterior análise de MAPKs, da Akt e da GSK-3 β através do *western blotting* (elaborado por Juliana Ben).

Tabela 1: Estágios da evolução comportamental do *kindling* de acordo com a escala de Racine.

Escala de Racine	
Estágios	Comportamento
1	Clônus facial
2	Movimentação de flexão e extensão da cabeça
3	Clônus de patas
4	Permanência de pé apenas sobre as patas traseiras (<i>rearing</i>)
5	<i>Rearing</i> seguido de queda

Estágios 1 a 5 de Racine, com ordem crescente da intensidade das manifestações epiléticas comportamentais (Adaptado de Racine, 1972a, 1972b).

A progressão do *kindling* (indicador de epileptogênese) foi determinada pelo número de dias com crise convulsiva (estágios 4 ou 5 de Racine) e a latência da crise convulsiva (indicador de limiar para ictogênese) foi determinada através do tempo entre a injeção de PTZ e a ocorrência da crise convulsiva no último dia de estimulação (Figura 6). Os animais submetidos ao modelo do *kindling* por PTZ progrediram na gravidade das crises convulsivas, determinada pelo surgimento de crise convulsiva bem como pela redução na latência para ocorrência das crises convulsivas nos dias subsequentes à estimulação química com PTZ (Tabela 2).

Foram utilizados neste experimento 39 animais, destes, sete foram do grupo controle e 32 animais foram utilizados para indução do *kindling* por PTZ, sendo que 28,1% (n = 9) não tiveram crise convulsiva, 65,6% (n = 21) tiveram crises convulsivas (destes apenas 2 animais morreram), e 6,3% (n = 2) foram animais que apresentaram uma crise convulsiva no meio do tratamento e não convulsionaram novamente, sendo excluídos do estudo (Tabela 2). Para a análise dos parâmetros neuroquímicos separamos os animais em grupos estratificados de acordo com a quantidade de dias com crise convulsiva (Tabela 3), utilizando um “n” de 4 animais por grupo escolhidos aleatoriamente para fins de análise no *western blotting*.

Figura 6: Esquema ilustrativo da progressão do *kindling* por PTZ e latência para última crise.

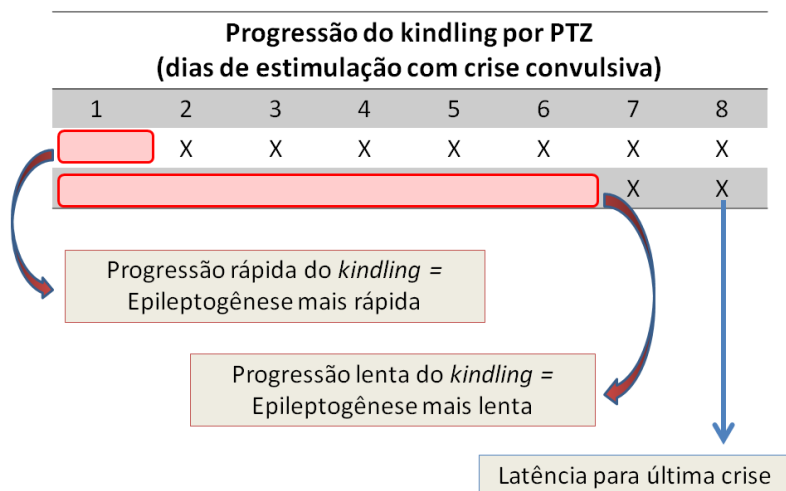


Ilustração esquemática da progressão do *kindling* por PTZ em sua forma rápida (epileptogênese mais rápida) e lenta (epileptogênese mais lenta), bem como da latência para a última crise convulsiva utilizada como parâmetro do limiar para ictogênese neste estudo. X: dia com crise convulsiva (elaborado por Juliana Ben).

Após realizar o experimento piloto de PTZ dose única, demonstramos que 48 h após a estimulação (doses subconvulsivas e convulsivas) não foram encontradas alterações significativas nas avaliações neuroquímicas de interesse. A partir disto, no experimento do *kindling* por PTZ, os animais foram eutanasiados por decapitação 48 h após a última injeção de PTZ. Os cérebros dos animais foram imediatamente isolados e lavados em solução salina (4°C), o neocórtex e o hipocampo foram dissecados sobre uma placa de Petri a 4°C e imediatamente congelados no nitrogênio líquido e mantidos no freezer -80°C para posterior análise por western blotting. Com a intenção de obter modificações neuroquímicas duradouras do modelo do *kindling* por PTZ, o intervalo de 48 h foi escolhido após terem sido eliminados os possíveis efeitos residuais da droga ou da crise convulsiva *per se* através do experimento de PTZ dose única.

Tabela 2: Perfil geral da avaliação comportamental e da latência para o primeiro e último dias com crise convulsiva dos animais submetidos ao modelo do *kindling* por PTZ.

Porcentagem de animais com crise convulsiva e latência para a primeira e última crise (estágio 4 ou 5 de Racine)				
Crise Convulsiva	"N"	Percentual	Latência para a 1ª Crise em segundos (média ± E.P.M.)	Latência para a Última Crise em segundos (média ± E.P.M.)
Não	9	28,1	-	-
Sim (2 óbitos)	21	65,6	380.7 ± 46,58	255,6 ± 29,44 *
Problema	2	6,3	-	-
Total	32	100,0	-	-

Após o termino do protocolo houve uma redução significativa da latência para o último dia de crise convulsiva (teste t para amostras pareadas, $p < 0.001$), na análise foram incluídos animais que apresentaram ao menos 1 crise convulsiva. Nove animais mostraram-se resistentes ao *kindling* não apresentando manifestações sugestivas de crise epilética com gravidade acima do estágio 3 de Racine (elaborado por Juliana Ben).

3.4. WESTERN BLOTTING

Para o processamento das amostras, o neocórtex e o hipocampo foram homogeneizados em Tampão de Amostra (200 mM de Tris, 40 mM de EDTA, 4% de SDS, pH 6,8), relação p/v (0,25 g tecido/mL), acrescidos de inibidores de proteases e fosfatases, e o homogenato foi então fervido por 5 minutos. Sobre essa solução de amostra foi adicionado Tampão de Diluição na proporção de 1:4 (40% glicerol, 50 mM de Tris e azul de bromofenol) e β -mercaptoetanol na concentração final de 5% (v/v). As proteínas totais das amostras foram dosadas pelo método de Lowry modificado (PETERSON, 1977) e foram separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) contendo SDS (SDS-PAGE; miniVE Vertical Electrophoresis System®, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA). As proteínas foram transferidas

para nitrocelulose em sistema “semidry” (TE 70 SemiPhor[®] Unit, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA) e as formas totais e fosforiladas foram identificadas através do uso de anticorpos específicos para ERK1/2, JNK1/2, p38^{MAPK}, Akt e GSK-3 β (CORDOVA et al., 2004; LEAL et al., 2007). A revelação dos *immunoblottings* foi realizada através de quimiluminescência e a densitometria das bandas foi determinada com o uso do programa Scion[®] Image (Frederick, MD, EUA) e os níveis de fosforilação foram obtidos pela relação das densidades ópticas das formas fosforilada/total (POSSER et al., 2007). Os resultados foram expressos como porcentagem da razão fosforilada/total, em relação ao controle (100%) \pm E.P.M.

Tabela 3: Distribuição dos animais em grupos de acordo com a gravidade de progressão do *kindling* por PTZ.

Total de dias com crise			
Grupos	Número de dias com crises	Quantidade de animais	Percentual
S0	0	9	30,0
S1,3	1	3	10,0
	3	3	10,0
S4	4	4	13,3
S5	5	7	23,4
S6,7	6	3	10,0
	7	1	3,3
	Total	30	100,0

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: S0, animais que não apresentaram crises convulsivas (resistentes ao *kindling* por PTZ); S1,3, animais que tiveram 1 a 3 dias com crise convulsiva; S4, animais que tiveram 4 dias com crise convulsiva; S5, animais que tiveram 5 dias com crise convulsiva; S6,7, animais que tiveram 6 a 7 dias com crise convulsiva (elaborado por Juliana Ben).

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística será descrita especificamente em cada capítulo para facilitar a compreensão dos resultados.

4. RESULTADOS

4.1. CAPÍTULO I - NÍVEIS DE MAPKS NO MODELO DO *KINDLING* INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL

Effects of pentylenetetrazole *kindling* on mitogen activated protein kinases (MAPKs) levels in neocortex and hippocampus of mice. Ben J, de Oliveira PA, Gonçalves FM, Peres TV, Matheus FC, Leal RB, Walz R, Prediger RD.

ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA NEUROSCIENCE.

Este conjunto de experimentos nos permitiu avaliar possíveis diferenças nos níveis de MAPKs entre os animais tratados com a solução controle e os animais com gravidade variável de progressão no *kindling*, incluindo os resistentes (que não apresentaram crises convulsivas) e os que apresentaram um número máximo de dias com crise convulsiva (7 dias). Todas as variáveis (progressão do *kindling* por PTZ, latência para a ocorrência da crise convulsiva no último dia de estimulação e parâmetros neuroquímicos) apresentaram distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Para a análise estatística, as diferenças entre os grupos controle e de animais submetidos ao *kindling* (diferentes graus de progressão) foram investigadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni quando apropriado. Níveis de significância de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Foi utilizado o programa de estatística SPSS 17.0 (Chicago, USA).

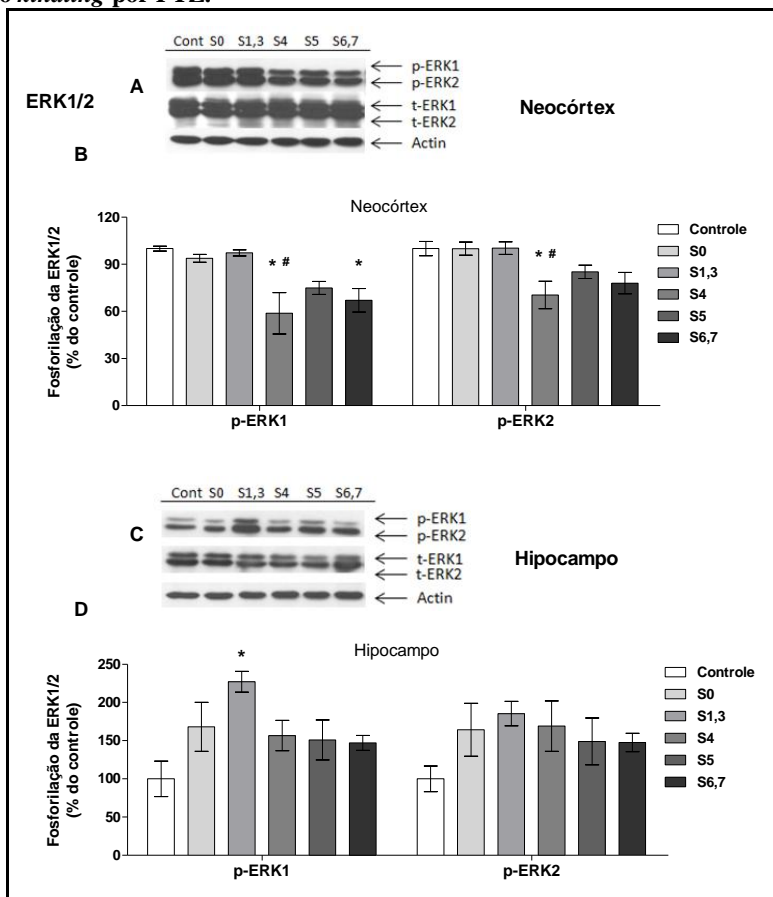
As Figuras 7B, 8B e 9B mostram os níveis de fosforilação (atividade) de MAPKs no neocórtex do grupo controle e dos grupos tratados com PTZ estratificados de acordo com o número de dias com crise convulsiva após 8 estimulações. Não houve diferença significativa na fosforilação de JNK1, JNK2 e $p38^{\text{MAPK}}$ entre os grupos ($p > 0,62$, Figura 8 e 9, respectivamente). Já os níveis de fosforilação de ERK1 [$F(5,18) = 6,70$; $p = 0,001$] e de ERK2 [$F(5,18) = 5,18$; $p = 0,004$] apresentaram diferenças significativas em comparação ao grupo controle, as quais variaram de acordo com o número de dias que os animais apresentaram crise convulsiva (progressão do *kindling*). Os animais que tiveram 4, 6 e 7 dias com crise convulsiva apresentaram uma diminuição da atividade de ERK1 no neocórtex ($p < 0,05$) comparados ao grupo controle, enquanto que os animais que tiveram 4

dias com crise convulsiva apresentaram uma diminuição de ERK1 e 2 tanto em relação ao grupo controle ($p < 0,03$) quanto em relação aos grupos de animais resistentes ($p < 0,03$) e com 1 a 3 dias com crise convulsiva ($p < 0,03$). Não houve diferença significativa ($p > 0,20$) no conteúdo total de MAPKs no neocórtex entre o grupo controle e os grupos tratados com PTZ.

As Figuras 7D, 8D e 9D mostram os níveis de fosforilação (ativação) de MAPKs no hipocampo do grupo controle e dos grupos tratados com PTZ estratificados de acordo com o número de dias com crise convulsiva após 8 estimulações. Os níveis de fosforilação de ERK2, JNK1 e p38^{MAPK} não diferiram entre o grupo controle e os grupos tratados com PTZ ($p > 0,20$). Em comparação ao grupo controle, os animais tratados com PTZ que apresentaram 1 a 3 dias com crise convulsiva apresentaram um aumento significativo nos níveis de fosforilação de ERK1 [$F(5,18) = 3,44$; $p = 0,02$] e de JNK2 [$F(5,18) = 2,92$; $p = 0,04$] no hipocampo. Não houve diferença significativa ($p > 0,24$) no conteúdo de MAPKs totais no hipocampo entre o grupo controle e os grupos tratados com PTZ.

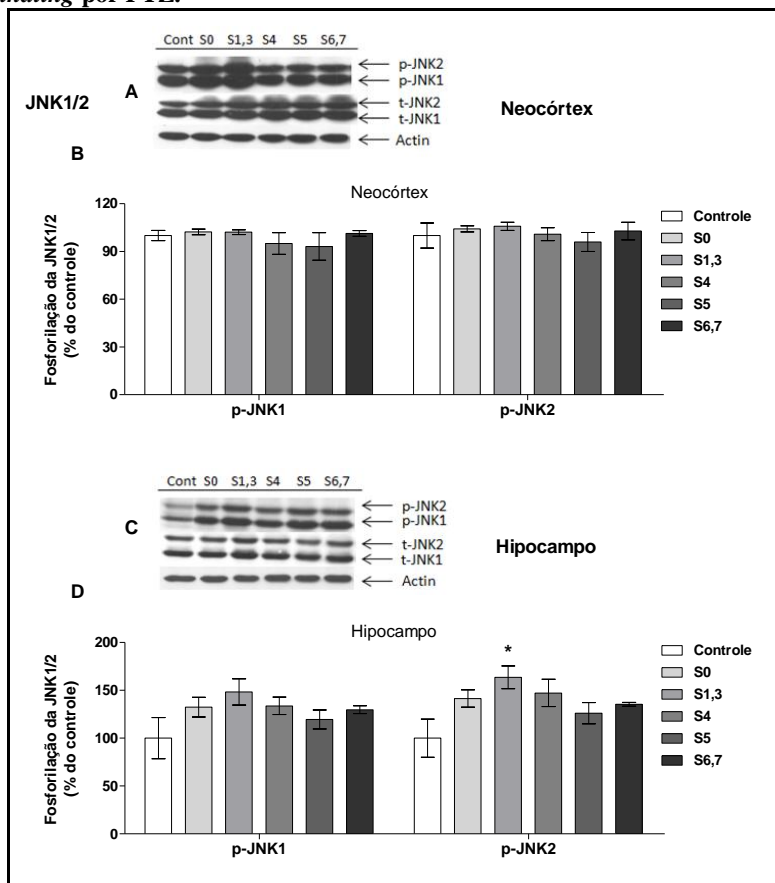
Os animais tratados com dose única de 35 mg/kg de PTZ não apresentaram comportamento indicativo de crise convulsiva. Todos os animais que receberam PTZ na dose de 60 mg/kg apresentaram crise convulsiva avaliada comportamentalmente (estágios 4 ou 5 de Racine). A administração de PTZ dose única (35 mg/kg ou 60 mg/kg) não induziu mudanças nos níveis de MAPKs fosforiladas e totais no neocórtex e no hipocampo após 48 horas da administração da droga ($p > 0,20$, Figuras 10, 11 e 12). Estes resultados sugerem que as modificações observadas 48 horas após a última crise induzida pelo PTZ nos animais submetidos ao kindling não sejam decorrentes de efeito do fármaco e/ou da crise convulsiva *per se*.

Figura 7: Níveis de fosforilação de ERK1/2 em camundongos submetidos ao kindling por PTZ.



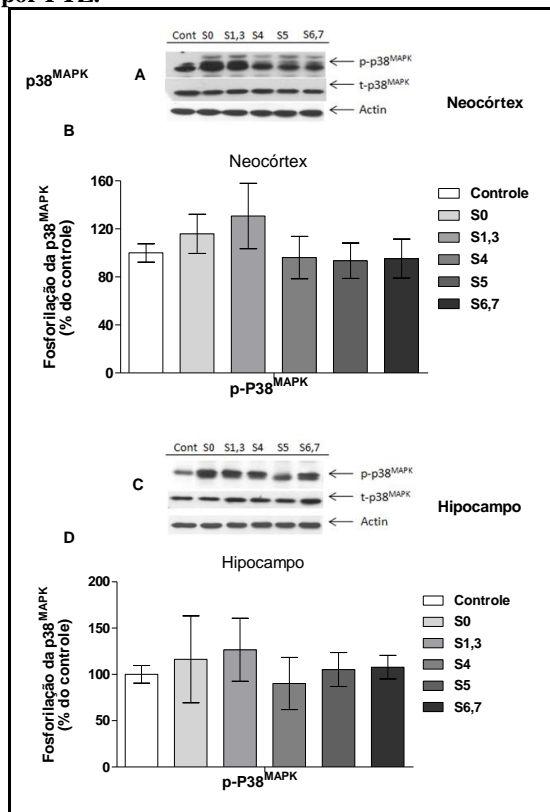
Análise por *western blotting* da fosforilação de ERK1/2 e seu conteúdo total no neocórtex (A, B) e no hipocampo (C, D). As figuras A e C mostram o *western blotting* representativo da imunorreatividade de ERK1/2 fosforiladas e totais, e da actina. As figuras B e D mostram as quantificações por densitometria óptica (DO) dos grupos experimentais em percentual do controle. Todos os grupos receberam 8 injeções, o grupo controle recebeu salina e o grupo tratado recebeu PTZ sendo este último dividido de acordo com a quantidade de dias com crise convulsiva: 0 dia (S0), 1 a 3 dias (S1,3), 4 dias (S4), 5 dias (S5), e 6 e 7 dias (S6,7) ao longo das 8 estimulações. A revelação foi realizada por quimioluminescência e a densitometria das bandas foi determinada através da utilização do programa Scion Image. Os dados são expressos em média \pm E.P.M., * $p < 0,05$ em relação ao controle e # $p < 0,05$ em relação ao grupo S0 e S1,3 (ANOVA de uma via, seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni).

Figura 8: Níveis de fosforilação de JNK1/2 em camundongos submetidos ao kindling por PTZ.



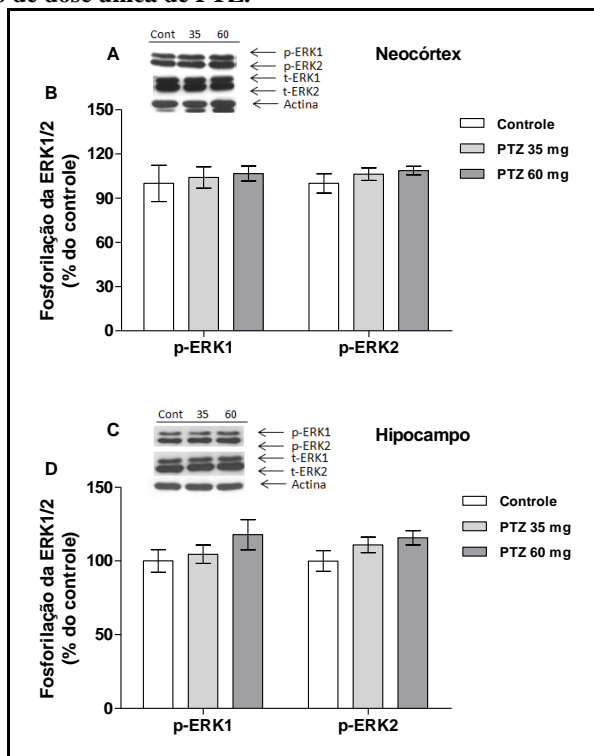
Análise por *western blotting* da fosforilação de JNK1/2/3 (sendo que a JNK2 representa a JNK2 e 3) e seu conteúdo total no neocórtex (A, B) e no hipocampo (C, D). As figuras A e C mostram o *western blotting* representativo da imunorreatividade de JNK1/2/3 fosforiladas e totais, e da actina. As figuras B e D mostram as quantificações por densitometria óptica (DO) dos grupos experimentais em percentual do controle. Todos os grupos receberam 8 injeções, o grupo controle recebeu salina e o grupo tratado recebeu PTZ sendo este último dividido de acordo com a quantidade de dias com crise convulsiva: 0 dia (S0), 1 a 3 dias (S1,3), 4 dias (S4), 5 dias (S5), e 6 e 7 dias (S6,7) ao longo das 8 estimulações. A revelação foi realizada por quimioluminescência e a densitometria das bandas foi determinada através da utilização do programa Scion Image. Os dados são expressos em média \pm E.P.M., * $p < 0,05$ em relação ao controle. (ANOVA de uma via, seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni).

Figura 9: Níveis de fosforilação de p38^{MAPK} em camundongos submetidos ao kindling por PTZ.



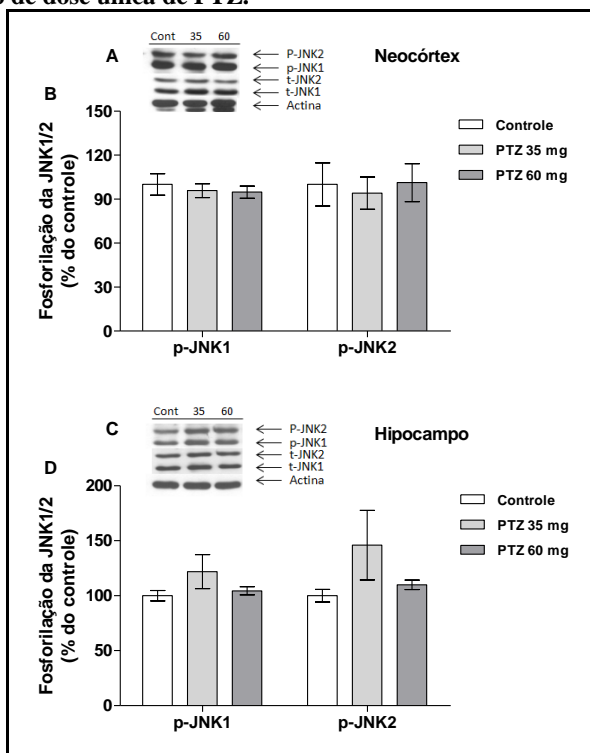
Análise por *western blotting* da fosforilação de p38^{MAPK} e seu conteúdo total no neocórtex (A, B) e no hipocampo (C, D). As figuras A e C mostram o *western blotting* representativo da imunorreatividade de p38^{MAPK} fosforiladas e totais, e da actina. As figuras B e D mostram as quantificações por densitometria óptica (DO) dos grupos experimentais em percentual do controle. Todos os grupos receberam 8 injeções, o grupo controle recebeu salina e o grupo tratado recebeu PTZ sendo este último dividido de acordo com a quantidade de dias com crise convulsiva: 0 dia (S0), 1 a 3 dias (S1,3), 4 dias (S4), 5 dias (S5), e 6 e 7 dias (S6,7) ao longo das 8 estimulações. A revelação foi realizada por quimioluminescência e a densitometria das bandas foi determinada através da utilização do programa Scion Image. Os dados são expressos em média \pm E.P.M. (ANOVA de uma via).

Figura 10: Níveis de fosforilação de ERK1/2 em camundongos submetidos ao modelo de dose única de PTZ.



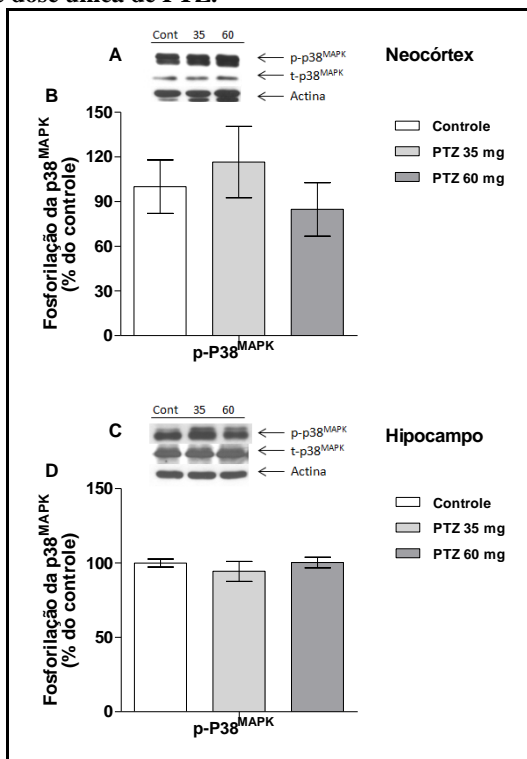
Análise por *western blotting* da fosforilação de ERK1/2 e seu conteúdo total no neocórtex (A, B) e no hipocampo (C, D). As figuras A e C mostram o *western blotting* representativo da imunoreatividade de ERK1/2 fosforiladas e totais, e da actina. As figuras B e D mostram as quantificações por densitometria óptica (DO) dos grupos experimentais em percentual do controle. O grupo controle recebeu salina e o grupo tratado recebeu PTZ sendo este último dividido de acordo com a dosagem de PTZ utilizada: 35 mg/kg (subconvulsiva) ou 60 mg/kg (convulsiva). A revelação foi realizada por quimioluminescência e a densitometria das bandas foi determinada através da utilização do programa Scion Image. Os dados são expressos em média \pm E.P.M. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,20$, ANOVA de uma via).

Figura 11: Níveis de fosforilação de JNK1/2 em camundongos submetidos ao modelo de dose única de PTZ.



Análise por *western blotting* da fosforilação de JNK1/2 e seu conteúdo total no neocórtex (A, B) e no hipocampo (C, D). As figuras A e C mostram o *western blotting* representativo da imunorreatividade de JNK1/2 fosforiladas e totais, e da actina. As figuras B e D mostram as quantificações por densitometria óptica (DO) dos grupos experimentais em percentual do controle. O grupo controle recebeu salina e o grupo tratado recebeu PTZ sendo este último dividido de acordo com a dosagem de PTZ utilizada: 35 mg/kg (subconvulsiva) ou 60 mg/kg (convulsiva). A revelação foi realizada por quimioluminescência e a densitometria das bandas foi determinada através da utilização do programa Scion Image. Os dados são expressos em média \pm E.P.M. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,20$, ANOVA de uma via).

Figura 12: Níveis de fosforilação de p38^{MAPK} em camundongos submetidos ao modelo de dose única de PTZ.



Análise por *western blotting* da fosforilação de p38^{MAPK} e seu conteúdo total no neocórtex (A, B) e no hipocampo (C, D). As figuras A e C mostram o *western blotting* representativo da imunorreatividade de p38^{MAPK} fosforiladas e totais, e da actina. As figuras B e D mostram as quantificações por densitometria óptica (DO) dos grupos experimentais em percentual do controle. O grupo controle recebeu salina e o grupo tratado recebeu PTZ sendo este último dividido de acordo com a dosagem de PTZ utilizada: 35 mg/kg (subconvulsiva) ou 60 mg/kg (convulsiva). A revelação foi realizada por quimioluminescência e a densitometria das bandas foi determinada através da utilização do programa Scion Image. Os dados são expressos em média \pm E.P.M. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,20$, ANOVA de uma via).

4.2. CAPÍTULO II - MAPKS, LATÊNCIA PARA CRISE E PROGRESSÃO DO *KINDLING* INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL

Brain MAPKs levels are differentially associated with seizures threshold and severity progression in pentylene-tetrazole-kindled mice. Ben J, Marques Gonçalves F, Alexandre Oliveira P, Vieira Peres T, Hohl A, Bainy Leal R, Abrão Cavalheiro E, Daniel Schroder Prediger R, Walz R. **CNS Neurosci Ther.** 2013 Sep;19(9):726-9.

Neste estudo investigamos a associação entre os níveis de MAPKs no neocórtex e no hipocampo de camundongos que apresentaram mais de dois dias com crise convulsiva durante o *kindling* com a progressão do *kindling* e a latência para ocorrência da crise convulsiva no último dia de estímulo. Nesta análise excluímos os animais que não apresentaram crises convulsivas, pois não havia latência do primeiro e último dia com crise convulsiva disponível para a análise. Também excluímos animais que tiveram apenas 1 ou 2 dias com crises convulsivas, pois a intenção era avaliar apenas animais que tivessem atingido inequivocamente o *kindling*.

Todas as variáveis analisadas (progressão do *kindling* por PTZ, latência para o primeiro dia com crise convulsiva, latência para o último dia com crise convulsiva e parâmetros neuroquímicos) apresentaram distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Inicialmente foi feita uma análise univariada utilizando a regressão linear para determinar o grau de associação entre cada uma das variáveis neuroquímicas (MAPKs fosforiladas e totais) e a progressão do *kindling* (número de dias com crise convulsiva) e a latência para a crise convulsiva no último dia de estimulação. Nesta análise foram identificadas associações com grau de significância de $p \leq 0,20$ (Tabela 4A e 5A, respectivamente). Num segundo momento foram realizadas duas análises por regressão linear múltipla para identificar quais MAPKs mantiveram-se independentemente associadas: 1) ao número de dias com crise convulsiva (Tabela 4B) e; 2) à latência para o último dia com crise convulsiva (Tabela 5B). Devido à plausibilidade biológica, nós também incluímos na análise a latência de início da crise convulsiva que o animal apresentou no primeiro dia com crise convulsiva, pois esta variável caracteriza a predisposição (limiar) dos animais para apresentarem a primeira crise convulsiva. Níveis de

significância de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A análise estatística foi feita com auxílio do programa SPSS 17.0 (Chicago, EUA).

O modelo final de regressão linear múltipla incluindo a ERK1 fosforilada, a JNK2 fosforilada, a JNK1 fosforilada e a JNK1 total no hipocampo apresentou uma forte correlação ($R = 0,87$) com a progressão do *kindling* estimada pelo número de dias com crise convulsiva (Tabela 4B). A ERK1 e JNK2 fosforiladas apresentaram uma correlação negativa e independente com o número de dias com crise convulsiva, ou seja, quanto mais dias com crise convulsiva os animais tinham, menor o nível de atividade (fosforilação) destas proteínas cinases. Já a JNK1 fosforilada e total apresentaram uma correlação positiva e independente do número de dias com crise convulsiva, ou seja, quanto mais dias com crise convulsiva os animais tinham, maior o nível de atividade e quantidade de JNK1. Estas variáveis juntas explicam 75% da variação (R^2 ajustado = 0,75) no número de dias com crise convulsiva ($F = 7,58$, $p = 0,004$).

O modelo final de regressão linear múltipla incluindo a $p38^{\text{MAPK}}$ fosforilada no neocórtex e a latência para ocorrência da primeira crise convulsiva mostraram uma forte correlação ($R = 0,80$) positiva e independente com a latência para ocorrência da crise convulsiva após a última estimulação (Tabela 5B), ou seja, quanto maior a latência para o último dia de crise convulsiva, maior o nível de atividade (fosforilação) de $p38^{\text{MAPK}}$ e a latência para o primeiro dia de crise convulsiva. Estas variáveis juntas explicam 64% da variação (R^2 ajustado = 0,64) na latência para ocorrência da última crise convulsiva ($F = 10,4$, $p = 0,002$).

Tabela 4: Análise por regressão logística linear das variáveis neuroquímicas e comportamentais associadas à progressão do *kindling* por PTZ

A) Variáveis associadas à progressão do *kindling* por PTZ

Variáveis Preditivas	R	R ²	Coefficiente B	Valor de “p”
Latência para o último dia com crise convulsiva	0,45	0,20	- 0,004	0,09
Latência para o primeiro dia com crise convulsiva	0,09	0,009	0,000	0,74
Níveis de MAPKs no neocórtex				
ERK1 Total	0,05	0,003	- 0,02	0,85
ERK1 Fosforilada	0,32	0,10	- 0,02	0,24
ERK2 Total	0,45	0,20	- 0,18	0,09
ERK2 Fosforilada	0,28	0,08	- 0,02	0,31
JNK1 Total	0,21	0,04	- 0,08	0,45
JNK1 Fosforilada	0,03	0,001	0,004	0,91
JNK2 Total	0,52	0,07	- 0,15	0,05
JNK2 Fosforilada	0,08	0,007	- 0,01	0,76
p38 ^{MAPK} Total	0,10	0,01	0,007	0,71
p38 ^{MAPK} Fosforilada	0,33	0,11	- 0,01	0,22
Níveis de MAPKs no hipocampo				
ERK1 Total	0,06	0,004	0,007	0,82
ERK1 Fosforilada	0,56	0,31	- 0,01	0,03
ERK2 Total	0,13	0,02	0,009	0,63
ERK2 Fosforilada	0,32	0,10	- 0,008	0,24
JNK1 Total	0,35	0,12	0,03	0,20
JNK1 Fosforilada	0,36	0,13	- 0,02	0,19
JNK2 Total	0,35	0,12	0,02	0,20
JNK2 Fosforilada	0,49	0,25	- 0,04	0,06
p38 ^{MAPK} Total	0,50	0,25	- 0,02	0,06
p38 ^{MAPK} Fosforilada	0,23	0,05	- 0,006	0,41

B) Variáveis independentemente associadas à progressão do *kindling* por PTZ

Variáveis Preditivas	Coefficiente B (CI 95%)	Valor de “p”
Constante	- 6,27 (- 15,58 to - 3,04)	0,16
Níveis de MAPKs no hipocampo		
ERK1 Fosforilada	- 0,02 (- 0,04 to - 0,005)	0,003
JNK 2 Fosforilada	- 0,08 (- 0,12 to - 0,03)	0,002
JNK1 Total	0,08 (0,02 to 0,13)	0,009
JNK1 Fosforilada	0,13 (0,06 to 0,21)	0,001
Resumo do modelo: R = 0,87, R² = 0,75, F = 7,58, p = 0,004		

Nesta tabela são mostradas as associações das variáveis neuroquímicas (MAPKs) e comportamentais (latência para o primeiro e último dia com crise convulsiva) em relação à progressão do *kindling* por PTZ, bem como suas associações independentes. Os valores das variáveis neuroquímicas utilizados foram os mesmos valores utilizados ao longo de todo o estudo, quantificações por densitometria óptica (DO) em percentual do controle.

Tabela 1A - coeficiente R: indica o grau de correlação de cada variável neuroquímica e comportamental com a progressão do *kindling* por PTZ; coeficiente R²: indica o percentual da variação da progressão do *kindling* por PTZ explicado por cada uma das variáveis neuroquímicas e comportamentais; coeficiente B: coeficiente angular da regressão linear, indicando que para cada unidade de variação da variável neuroquímica ou comportamental existe uma variação na unidade de progressão do *kindling* por PTZ multiplicada por B, ou seja, para cada unidade de aumento ou diminuição (correlação positiva ou correlação negativa) da variável neuroquímica ou comportamental existe um aumento ou diminuição na unidade de medida da progressão do *kindling* por PTZ (dias com crise convulsiva).

Tabela 1B - coeficiente R: permite quantificar o grau de associabilidade entre a combinação das variáveis preditoras que permaneceram no modelo e a progressão do *kindling* por PTZ, explicando a associação do modelo como um todo, com todas as variáveis significativamente associadas de forma independente; coeficiente B: coeficiente angular da regressão linear que tem o mesmo significado e aplicabilidade que na análise univariada, corrigindo para a distribuição das demais variáveis neuroquímicas e comportamentais incluídas no modelo.

Tabela 5: Análise por regressão logística linear das variáveis neuroquímicas e comportamentais associadas à latência para o último dia com crise convulsiva no modelo de *kindling* por PTZ

A) Variáveis associadas à latência para o último dia com crise convulsiva no *kindling* por PTZ

Variáveis Preditivas	R	R ²	Coefficiente B	Valor de “p”
Número de dias com crise convulsiva	0,45	0,20	- 22,3	0,01
Latência para o primeiro dia com crise convulsiva	0,63	0,39	0,46	0,01
Níveis de MAPKs no neocórtex				
ERK1 Total	0,40	0,16	- 14,6	0,14
ERK1 Fosforilada	0,26	0,07	1,77	0,35
ERK2 Total	0,41	0,17	18,9	0,13
ERK2 Fosforilada	0,10	0,01	0,93	0,71
JNK1 Total	0,08	0,006	- 3,27	0,78
JNK1 Fosforilada	0,05	0,003	0,63	0,86
JNK2 Total	0,21	0,04	6,79	0,46
JNK2 Fosforilada	0,09	0,008	1,31	0,75
p38 ^{MAPK} Total	0,62	0,40	- 4,52	0,01
p38 ^{MAPK} Fosforilada	0,71	0,50	2,47	0,003
Níveis de MAPKs no hipocampo				
ERK1 Total	0,36	0,13	- 4,15	0,19
ERK1 Fosforilada	0,23	0,05	0,69	0,41
ERK2 Total	0,17	0,03	1,35	0,54
ERK2 Fosforilada	0,06	0,004	- 0,17	0,83
JNK1 Total	0,12	0,01	1,06	0,66
JNK1 Fosforilada	0,02	0,000	0,12	0,95
JNK2 Total	0,14	0,02	- 1,38	0,61
JNK2 Fosforilada	0,35	0,12	1,95	0,20
p38 ^{MAPK} Total	0,18	0,03	1,20	0,51
p38 ^{MAPK} Fosforilada	0,18	0,03	0,56	0,52

B) Variáveis independentemente associadas à latência para última crise convulsiva no *kindling* por PTZ

Variáveis Preditivas	Coefficiente B (CI 95%)	Valor de “p”
Constante	- 34,9 (- 192,4 to 122,4)	0,64
Latência para o primeiro dia com crise convulsiva	0,30 (0,001 to 0,61)	0,04
Níveis de MAPKs no neocórtex		
p38 ^{MAPK} Fosforilada	1,90 (0,44 to 3,35)	0,01
Resumo do modelo: R = 0,80, R² = 0,64, F = 10,4, p = 0,002		

Nesta tabela são mostradas as associações das variáveis neuroquímicas (MAPKs) e comportamentais (latência para o primeiro e último dia com crise convulsiva) em relação à latência para o último dia com crise convulsiva no modelo de *kindling* por PTZ, bem como suas associações independentes. Os valores das variáveis neuroquímicas utilizados foram os mesmos valores utilizados ao longo de todo o estudo, quantificações por densitometria óptica (DO) em percentual do controle.

Tabela 1A - coeficiente R: indica o grau de correlação de cada variável neuroquímica e comportamental com a latência para o último dia com crise convulsiva; coeficiente R²: indica o percentual da variação da latência para o último dia com crise convulsiva explicado por cada uma das variáveis neuroquímicas e comportamentais; coeficiente B: coeficiente angular da regressão linear, indicando que para cada unidade de variação da variável neuroquímica ou comportamental existe uma variação na unidade de latência para o último dia com crise convulsiva multiplicada por B, ou seja, para cada unidade de aumento ou diminuição (correlação positiva ou correlação negativa) da variável neuroquímica ou comportamental existe um aumento ou diminuição na unidade de medida da latência para o último dia com crise convulsiva.

Tabela 1B - coeficiente R: permite quantificar o grau de associabilidade entre a combinação das variáveis preditoras que permaneceram no modelo e a latência para o último dia com crise convulsiva, explicando a associação do modelo como um todo, com todas as variáveis significativamente associadas de forma independente; coeficiente B: coeficiente angular da regressão linear que tem o mesmo significado e aplicabilidade que na análise univariada, corrigindo para a distribuição das demais variáveis neuroquímicas e comportamentais incluídas no modelo.

4.3. CAPÍTULO III - NÍVEIS DE AKT E DE GSK-3 β NO MODELO DO *KINDLING* INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL

ARTIGO EM PREPARAÇÃO

Neste conjunto de experimentos avaliamos as possíveis diferenças nos níveis de Akt e de GSK-3 β dos animais controle e dos animais que apresentaram gravidade variável de progressão no *kindling*, desde os mais resistentes (que não apresentaram crises convulsivas) até os que apresentaram o número máximo de dias com crise convulsiva (7 dias). Todas as variáveis analisadas (progressão do *kindling* por PTZ, latência para a ocorrência da primeira crise convulsiva, latência para a ocorrência da crise convulsiva no último dia de estimulação e parâmetros neuroquímicos) apresentaram distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Para a análise estatística as diferenças entre os grupos controle e de animais submetidos ao *kindling* por PTZ (diferentes graus de progressão) foram investigadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni quando apropriado. Níveis de significância de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Foi utilizado o programa de estatística SPSS 17.0 (Chicago, USA).

A Figura 13B mostra os níveis de fosforilação (ativação) de Akt no neocórtex do grupo controle e dos grupos tratados com PTZ estratificados de acordo com o número de dias com crise convulsiva após 8 estimulações. Não houve diferença significativa na fosforilação de Akt entre os grupos ($p = 0,26$), bem como no seu conteúdo total no neocórtex entre o grupo controle e os grupos tratados com PTZ ($p = 0,97$).

A Figura 13D mostra os níveis de ativação de Akt no hipocampo do grupo controle e dos grupos tratados com PTZ estratificados de acordo com o número de dias com crise convulsiva após 8 estimulações. Os níveis de fosforilação e totais de Akt não diferiram entre o grupo controle e os grupos tratados com PTZ no hipocampo ($p = 0,43$ e $p = 0,24$, respectivamente).

A Figura 14B mostra os níveis de fosforilação de GSK-3 β (quando fosforilada está inativa) no neocórtex do grupo controle e dos grupos tratados com PTZ estratificados de acordo com o número de dias com crise convulsiva após 8 estimulações. Os níveis de fosforilação de GSK-3 β [$F(5,18) = 13,96$; $p < 0,001$] apresentaram diferenças significativas em comparação ao grupo controle, sendo variáveis de

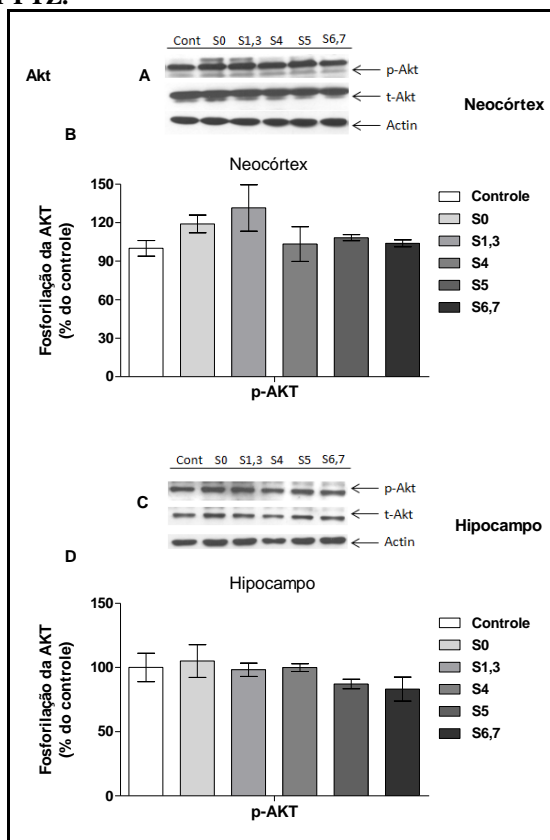
acordo com o número de dias que os animais apresentaram crise convulsiva (progressão do *kindling*). Os animais que foram resistentes ao *kindling* por PTZ e os que tiveram de 1 a 3 dias com crise convulsiva apresentaram uma maior fosforilação de GSK-3 β no neocórtex em relação ao grupo controle ($p = 0,05$ e $p = 0,004$, respectivamente), enquanto que os animais que tiveram de 4 a 7 dias com crise convulsiva apresentaram uma menor fosforilação de GSK-3 β quando comparados aos grupos de animais resistentes ao *kindling* por PTZ e de animais com 1 a 3 dias com crise convulsiva ($p < 0,01$).

A Figura 14D mostra os níveis de fosforilação de GSK-3 β no hipocampo do grupo controle e dos grupos tratados com PTZ estratificados de acordo com o número de dias com crise convulsiva após 8 estimulações. Os níveis de fosforilação de GSK-3 β não diferiram entre o grupo controle e os grupos tratados com PTZ ($p = 0,06$), bem como não houve diferença significativa ($p > 0,53$) no conteúdo total de GSK-3 β no hipocampo entre o grupo controle e os grupos tratados com PTZ.

A administração de PTZ dose única (35 mg/kg ou 60 mg/kg) não induziu mudanças nos níveis de Akt e de GSK-3 β fosforiladas e totais no neocórtex e no hipocampo após 48 horas da administração da droga (ANOVA, $p > 0,20$, Figuras 15 e 16). Estes resultados sugerem que as modificações observadas 48 horas após o último dia de crise convulsiva induzida pelo PTZ nos animais submetidos ao *kindling* não sejam decorrentes dos efeitos do fármaco e/ou da crise convulsiva *per se*.

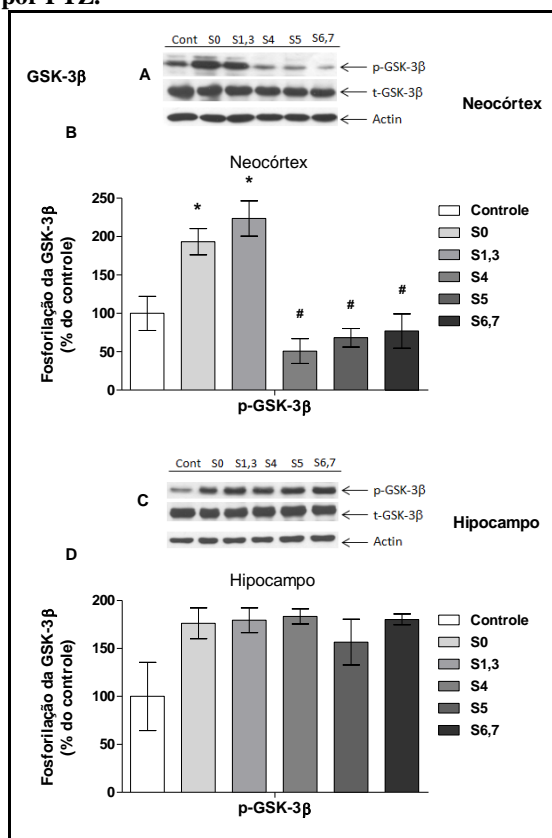
Os animais tratados com dose única de 35 mg/kg de PTZ não apresentaram comportamento indicativo de crise convulsiva. Todos os animais que receberam PTZ na dose de 60 mg/kg apresentaram crise convulsiva avaliada comportamentalmente (estágios 4 ou 5 de Racine).

Figura 13: Níveis de fosforilação de Akt em camundongos submetidos ao kindling por PTZ.



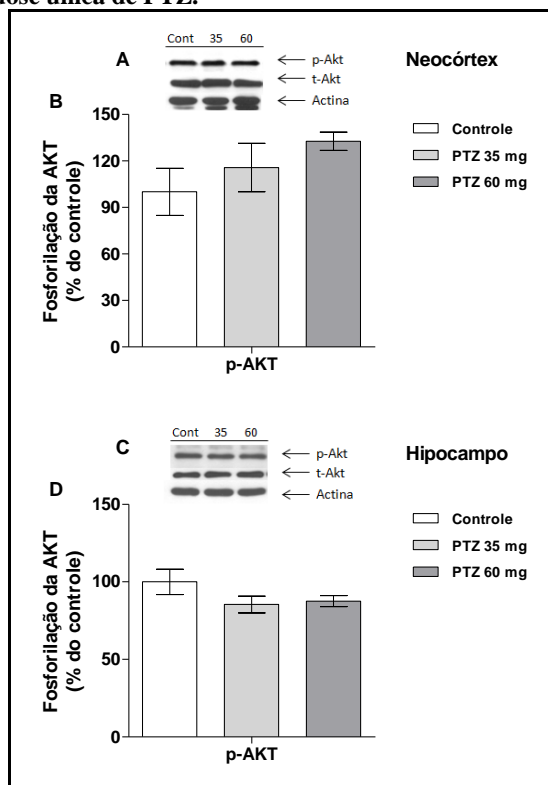
Análise por *western blotting* da fosforilação de Akt e seu conteúdo total no neocórtex (A, B) e no hipocampo (C, D). As figuras A e C mostram o *western blotting* representativo da imunorreatividade de Akt fosforiladas e totais, e da actina. As figuras B e D mostram as quantificações por densitometria óptica (DO) dos grupos experimentais em percentual do controle. Todos os grupos receberam 8 injeções, o grupo controle recebeu salina e o grupo tratado recebeu PTZ sendo este último dividido de acordo com a quantidade de dias com crise convulsiva: 0 dia (S0), 1 a 3 dias (S1,3), 4 dias (S4), 5 dias (S5), e 6 e 7 dias (S6,7) ao longo das 8 estimulações. A revelação foi realizada por quimioluminescência e a densitometria das bandas foi determinada através da utilização do programa Scion Image. Os dados são expressos em média \pm E.P.M. (ANOVA de uma via).

Figura 14: Níveis de fosforilação de GSK-3 β em camundongos submetidos ao *kindling* por PTZ.



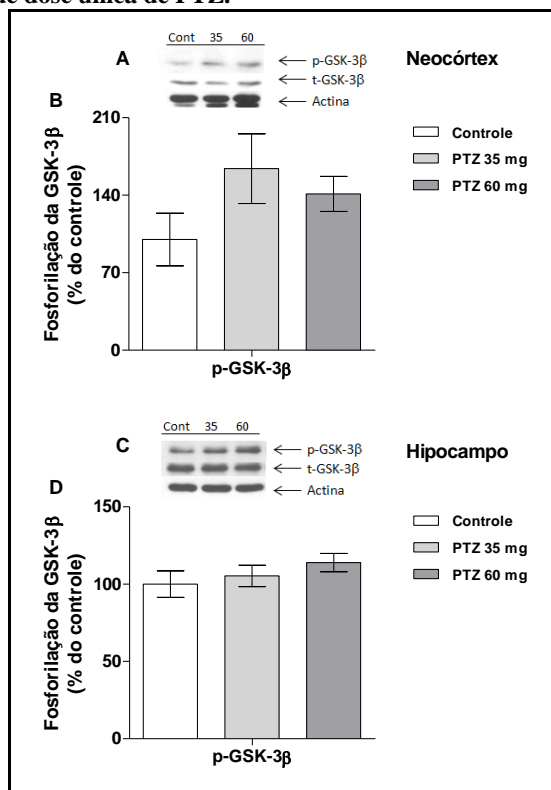
Análise por *western blotting* da fosforilação de GSK-3 β e seu conteúdo total no neocórtex (A, B) e no hipocampo (C, D). As figuras A e C mostram o *western blotting* representativo da imunorreatividade de GSK-3 β fosforiladas e totais, e da actina. As figuras B e D mostram as quantificações por densitometria óptica (DO) dos grupos experimentais em percentual do controle. Todos os grupos receberam 8 injeções, o grupo controle recebeu salina e o grupo tratado recebeu PTZ sendo este último dividido de acordo com a quantidade de dias com crise convulsiva: 0 dia (S0), 1 a 3 dias (S1,3), 4 dias (S4), 5 dias (S5), e 6 e 7 dias (S6,7) ao longo das 8 estimulações. A revelação foi realizada por quimioluminescência e a densitometria das bandas foi determinada através da utilização do programa Scion Image. Os dados são expressos em média \pm E.P.M., * $p < 0,05$ em relação ao controle e # $p < 0,01$ em relação ao grupo S0 e S1,3 (ANOVA de uma via, seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni).

Figura 15: Níveis de fosforilação de Akt em camundongos submetidos ao modelo de dose única de PTZ.



Análise por *western blotting* da fosforilação de Akt e seu conteúdo total no neocórtex (A, B) e no hipocampo (C, D). As figuras A e C mostram o *western blotting* representativo da imunorreatividade de Akt fosforilada e total, e da actina. As figuras B e D mostram as quantificações por densitometria óptica (DO) dos grupos experimentais em percentual do controle. O grupo controle recebeu salina e o grupo tratado recebeu PTZ sendo este último dividido de acordo com a dosagem de PTZ utilizada: 35 mg/kg (subconvulsiva) ou 60 mg/kg (convulsiva). A revelação foi realizada por quimioluminescência e a densitometria das bandas foi determinada através da utilização do programa Scion Image. Os dados são expressos em média \pm E.P.M. $p > 0,20$ (ANOVA de uma via).

Figura 16: Níveis de fosforilação de GSK-3 β em camundongos submetidos ao modelo de dose única de PTZ.



Análise por *western blotting* da fosforilação de GSK-3 β e seu conteúdo total no neocórtex (A, B) e no hipocampo (C, D). As figuras A e C mostram o *western blotting* representativo da imunorreatividade de GSK-3 β fosforilada e total, e da actina. As figuras B e D mostram as quantificações por densitometria óptica (DO) dos grupos experimentais em percentual do controle. O grupo controle recebeu salina e o grupo tratado recebeu PTZ sendo este último dividido de acordo com a dosagem de PTZ utilizada: 35 mg/kg (subconvulsiva) ou 60 mg/kg (convulsiva). A revelação foi realizada por quimioluminescência e a densitometria das bandas foi determinada através da utilização do programa Scion Image. Os dados são expressos em média \pm E.P.M. $p > 0,20$ (ANOVA de uma via).

Uma segunda análise, semelhante à apresentada no capítulo II, foi realizada para investigar a associação entre os níveis de Akt e de GSK-3 β no neocórtex e no hipocampo tanto com a progressão do *kindling* por PTZ, como com a latência para ocorrência da crise convulsiva no último dia de estímulo.

Inicialmente realizamos uma regressão linear simples para determinar o grau de associação entre cada uma das variáveis neuroquímicas (Akt e GSK-3 β totais e fosforiladas) no neocórtex e no hipocampo com a progressão do *kindling* por PTZ (número de dias com crise convulsiva, Tabela 6A) e a latência para a crise convulsiva no último dia de estimulação (Tabela 7A). Nesta análise foram identificadas associações com grau de significância de $p \leq 0,20$. Num segundo momento foram realizadas 2 análises por regressão linear múltipla para identificar quais variáveis neuroquímicas mantiveram-se independentemente associadas: 1) ao número de dias com crise convulsiva (Tabela 6B) e; 2) à latência para o último dia com crise convulsiva (Tabela 7B).

Devido à plausibilidade biológica nós também incluímos na análise a latência de início da crise convulsiva que o animal apresentou no primeiro dia com crise convulsiva, pois esta variável caracteriza a predisposição (limiar) dos animais. Nesta análise, diferentemente do que fizemos no capítulo II, todos os animais submetidos ao *kindling* por PTZ foram incluídos na análise. Para isso, atribuímos arbitrariamente aos animais que não apresentaram crises convulsivas durante o protocolo de *kindling* o valor de 1000 segundos para as latências do primeiro e do último dia com crise convulsiva. Após a inclusão destas latências constatamos a persistência de normalidade da distribuição das mesmas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Níveis de significância de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A análise estatística foi feita com auxílio do programa SPSS 17.0 (Chicago, EUA).

A análise univariada evidenciou uma associação negativa entre a progressão do *kindling* por PTZ e a latência para o primeiro dia com crise convulsiva, a latência para o último dia com crise convulsiva e os níveis de GSK-3 β fosforilada no neocórtex (Tabela 6A). Também foi observada uma tendência não significativa ($p = 0,09$) para uma associação negativa entre a progressão do *kindling* por PTZ e os níveis de Akt fosforilada no hipocampo. Após a análise por regressão linear múltipla foi possível demonstrar uma associação positiva e independente entre a progressão do *kindling* e a latência para o primeiro

dia com crise convulsiva. A progressão do *kindling* esteve associada negativamente e de forma independente à latência para o último dia de crise convulsiva e aos níveis de GSK-3 β fosforilada no neocórtex (Tabela 6B). O modelo de regressão linear múltipla incluindo a latência para o primeiro e último dia com crise convulsiva e os níveis de GSK-3 β fosforilada no neocórtex apresentou uma forte correlação ($R = 0,92$), sendo capaz de explicar 85% da variação da progressão do *kindling* (Tabela 6B).

A análise univariada mostrou que a latência para o último dia com crise convulsiva foi positivamente associada à latência para o primeiro dia com crise convulsiva, e negativamente associada à progressão do *kindling* por PTZ (Tabela 7). Houve uma tendência não significativa ($p \leq 0,12$) para a associação positiva da latência para o último dia com crise convulsiva com os níveis de GSK-3 β e Akt fosforilada no neocórtex e de Akt fosforilada no hipocampo, e para a associação negativa da latência para o último dia com crise convulsiva com a Akt total do hipocampo (Tabela 7A). Após a análise por regressão linear múltipla foi possível demonstrar uma associação positiva e independente da latência para o último dia com crise convulsiva com a latência para o primeiro dia com crise convulsiva e os níveis de Akt fosforilada no hipocampo. A regressão múltipla também evidenciou uma associação negativa e independente entre a latência para último dia com crise convulsiva com a progressão do *kindling* e os níveis de GSK-3 β fosforilada no neocórtex (Tabela 7B). O modelo de regressão linear múltipla incluindo a latência para a primeira crise, a progressão do *kindling*, os níveis de GSK-3 β fosforilada no neocórtex e de Akt fosforilada no hipocampo apresentou uma forte correlação ($R = 0,97$) com a latência para a ocorrência da crise convulsiva no último dia de estimulação. O modelo é capaz de explicar 95% da variação da latência para o surgimento da crise convulsiva na última estimulação (Tabela 7B).

Para finalizar, a Tabela 8 mostra uma associação entre os níveis de GSK-3 β fosforilada e os níveis de Akt total e fosforilada e de GSK-3 β total no neocórtex. Esta análise indica que os níveis de fosforilação da GSK-3 β são positivamente e independentemente associados com os níveis totais e fosforilados de Akt, cinase que sabidamente fosforila e inativa a GSK-3 β .

Tabela 6: Análise por regressão logística linear das variáveis neuroquímicas e comportamentais associadas à progressão do *kindling* por PTZ

A) Variáveis associadas à progressão do <i>kindling</i> por PTZ				
Variáveis Preditivas	R	R ²	Coefficiente B	Valor de “p”
Latência para o último dia com crise convulsiva	0,88	0,78	- 0,006	< 0,0001
Latência para o primeiro dia com crise convulsiva	0,76	0,58	- 0,006	< 0,0001
Níveis de cinases no neocórtex				
GSK-3β Total	0,007	0	- 0,002	0,98
GSK-3β Fosforilada	0,67	0,45	- 0,02	0,001
Akt Total	0,05	0,003	- 0,009	0,83
Akt Fosforilada	0,29	0,08	- 0,03	0,22
Níveis de cinases no hipocampo				
GSK-3β Total	0,17	0,03	0,07	0,47
GSK-3β Fosforilada	0,06	0,004	- 0,005	0,79
Akt Total	0,26	0,07	0,02	0,27
Akt Fosforilada	0,39	0,15	- 0,05	0,09
B) Variáveis independentemente associadas à progressão do <i>kindling</i> por PTZ				
Variáveis Preditivas	Coefficiente B (CI 95%)		Valor de “p”	
Constante	6,3 (5,3 a 7,3)		< 0,0001	
Latência para o último dia com crise convulsiva	- 0,008 (- 0,12 a - 0,005)		< 0,0001	
Latência para o primeiro dia com crise convulsiva	0,005 (0,001 a 0,009)		0,02	
GSK-3β Fosforilada no Neocórtex	- 0,013 (- 0,20 a - 0,006)		0,001	
Resumo do modelo: R = 0,92, R ² = 0,85, F = 28,7, p < 0,0001				

A) Associações entre as variáveis neuroquímicas (Akt e GSK-3 β) e comportamentais (latência para o primeiro e último dia com crise convulsiva) e a progressão do *kindling* por PTZ (análise univariada por regressão linear); B) Associações independentes entre as variáveis neuroquímicas e comportamentais (latência para o primeiro e último dia com crise convulsiva) e a progressão do *kindling* por PTZ (análise multivariada por regressão linear múltipla). Os valores das variáveis neuroquímicas utilizados foram os mesmos valores utilizados ao longo de todo o estudo, quantificações por densitometria óptica (DO) em percentual do controle.

Tabela 7: Análise por regressão logística linear das variáveis neuroquímicas e comportamentais associadas à latência para o último dia com crise convulsiva no modelo de *kindling* por PTZ

A) Variáveis associadas à latência para o último dia com crise convulsiva no *kindling* por PTZ

Variáveis Preditivas	R	R²	Coefficiente B	Valor de “p”
Latência para o primeiro dia com crise convulsiva	0,92	0,84	1,0	< 0,0001
Progressão do <i>kindling</i> por PTZ	0,88	0,78	- 134,2	< 0,0001
Níveis de cinases no neocórtex				
GSK-3β Total	0,19	0,04	5,8	0,42
GSK-3β Fosforilada	0,42	1,7	1,7	0,06
Akt Total	0,18	0,04	- 4,6	0,41
Akt Fosforilada	0,41	0,17	6,0	0,07
Níveis de cinases no hipocampo				
GSK-3β Total	0,24	0,06	-13,6	0,30
GSK-3β Fosforilada	0,05	0,03	- 0,6	0,83
Akt Total	0,38	0,14	- 5,0	0,10
Akt Fosforilada	0,35	0,13	7,1	0,12

B) Variáveis independentemente associadas à latência para última crise convulsiva no *kindling* por PTZ

Variáveis Preditivas	Coefficiente B (CI 95%)	Valor de “p”
Constante	153 (- 187,9 a 494,8)	0,35
Latência para o primeiro dia com crise convulsiva	0,7 (0,6 a 0,9)	< 0,0001
Progressão do <i>kindling</i> por PTZ	- 64,8 (- 93,5 a - 36,5)	< 0,0001
GSK-3β Fosforilada no Neocórtex	- 1,0 (- 1,7 a - 0,36)	0,005
Akt Fosforilada no Hipocampo	2,8 (0,1 a 5,5)	0,05
Resumo do modelo: R = 0,95, R² = 0,87, F =72, p < 0,0001		

A) Associações entre as variáveis neuroquímicas (Akt e GSK-3β) e comportamentais (latência para o primeiro e último dia com crise convulsiva) e a latência para a última crise convulsiva no modelo de *kindling* por PTZ (análise univariada por regressão linear); B) Associações independentes entre as variáveis neuroquímicas e comportamentais (latência para o primeiro e último dia com crise convulsiva) e a latência para a última crise convulsiva no modelo de *kindling* por PTZ (análise multivariada por regressão linear múltipla). Os valores das variáveis neuroquímicas utilizados foram os mesmos valores utilizados ao longo de todo o estudo, quantificações por densitometria óptica (DO) em percentual do controle.

Tabela 8: Análise por regressão logística linear dos níveis de GSK-3 β fosforilada com os níveis de Akt total e fosforilada e de GSK-3 β total no neocórtex de animais submetidos ao modelo do *kindling* por PTZ.

A) Associação dos níveis de GSK-3 β fosforilada com os níveis de Akt total e fosforilada e de GSK-3 β total no neocórtex de animais submetidos ao modelo do *kindling* por PTZ

Variáveis Preditivas	R	R ²	Coefficiente B	Valor de “p”
Akt Total	0,07	0,004	0,43	0,74
Akt Fosforilada	0,39	0,15	1,5	0,04
GSK-3 β Total	0,02	0,0	- 0,9	0,92

B) Variáveis independentemente associadas à fosforilação de GSK-3 β no neocórtex

Variáveis Preditivas	Coefficiente B (CI 95%)	Valor de “p”
Constante	- 606 (- 1041 a - 170)	0,008
Akt Total	3,9 (0,95 a 6,8)	0,01
Akt Fosforilada	3,0 (1,3 a 4,8)	0,001
Resumo do modelo: R = 0,60, R² = 0,35, F =6,6, p = 0,005		

A) Associações entre a Akt total e fosforilada e a GSK-3 β total e a GSK-3 β fosforilada no neocórtex de animais submetidos ao modelo de *kindling* por PTZ (análise univariada por regressão linear); B) Associações independentes entre as variáveis neuroquímicas avaliadas e a GSK-3 β fosforilada no neocórtex de animais submetidos ao modelo de *kindling* por PTZ (análise multivariada por regressão linear múltipla). Os valores das variáveis neuroquímicas utilizados foram os mesmos valores utilizados ao longo de todo o estudo, quantificações por densitometria óptica (DO) em percentual do controle.

4.4. RESUMO DOS RESULTADOS

As Tabelas 9, 10, 11 e 12 mostram um resumo dos resultados encontrados em nosso estudo.

Tabela 9: Resumo dos resultados das avaliações neuroquímicas (fosforilação de ERK1/2, JNK1/2/3 e p38^{MAPK}, Akt e GSK-3 β) no modelo do *kindling* por PTZ estratificados de acordo com o número de dias com crise convulsiva.

		Grupos do <i>kindling</i> por PTZ				
	Moléculas de sinalização	S0	S1,3	S4	S5	S6,7
NEOCÓRTEX	ERK1	=	=	↓	=	↓
	ERK2	=	=	↓	=	=
	JNK1	=	=	=	=	=
	JNK2	=	=	=	=	=
	p38	=	=	=	=	=
	Akt	=	=	=	=	=
	GSK-3 β	↑	↑	↓	↓	↓
HIPOCAMP	ERK1	=	↑	=	=	=
	ERK2	=	=	=	=	=
	JNK1	=	=	=	=	=
	JNK2	=	↑	=	=	=
	p38	=	=	=	=	=
	Akt	=	=	=	=	=
	GSK-3 β	=	=	=	=	=

S0: grupo de animais que não apresentaram nenhum dia com crise convulsiva (resistentes ao *kindling* por PTZ); S1,3: grupo de animais que apresentaram 1 a 3 dias com crises convulsivas; S4: grupo de animais que apresentaram 4 dias com crises convulsivas; S5: grupo de animais que apresentaram 5 dias com crises convulsivas; S6,7: grupo de animais que apresentaram 6 a 7 dias com crises convulsivas. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA de uma via, seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni).

Tabela 10: Resumo dos resultados das associações independentes das variáveis neuroquímicas (MAPKs) e comportamentais (latências para o primeiro e último dia com crise convulsiva) e a progressão do *kindling* por PTZ e a latência para o último dia com crise convulsiva

Variáveis dependentes (desfecho)	Variáveis preditoras associadas independentemente ao desfecho	Tipo de correlação (+ ou -)
Progressão do <i>kindling</i> por PTZ	p-ERK1 no hipocampo	-
	p-JNK 2 no hipocampo	-
	t-JNK1 no hipocampo	+
	p-JNK1 no hipocampo	+
Latência para o último dia com crise convulsiva	Latência para o primeiro dia com crise convulsiva	+
	p-p38 no neocórtex	+

Nesta tabela são mostradas as variáveis que são independentemente preditoras da progressão do *kindling* por PTZ e da latência para o último dia com crise convulsiva no modelo do *kindling* por PTZ. Também é mostrado o tipo de correlação, positiva ou negativa, entre as variáveis analisadas. * $p < 0,05$ pela regressão linear múltipla.

Tabela 11: Resumo dos resultados das associações independentes das variáveis neuroquímicas (Akt e GSK-3 β) e comportamentais (latências para o primeiro e último dia com crise convulsiva) e a progressão do *kindling* por PTZ e a latência para o último dia com crise convulsiva

Variáveis dependentes (desfecho)	Variáveis preditoras associadas independentemente ao desfecho	Tipo de correlação (+ ou -)
Progressão do <i>kindling</i> por PTZ	Latência para o último dia com crise convulsiva	-
	Latência para o primeiro dia com crise convulsiva	+
	p-GSK-3 β no neocórtex	-
Latência para o último dia com crise convulsiva	Latência para o primeiro dia com crise convulsiva	+
	Progressão do <i>kindling</i> por PTZ	-
	p-GSK-3 β no neocórtex	-
	p-Akt no hipocampo	+

Nesta tabela são mostradas as variáveis que são independentemente preditoras da progressão do *kindling* por PTZ e da latência para o último dia com crise convulsiva no modelo do *kindling* por PTZ. Também é mostrado o tipo de correlação, positiva ou negativa, entre as variáveis analisadas. * $p < 0,05$ pela regressão linear múltipla.

Tabela 12: Resumo dos resultados das associações independentes das variáveis neuroquímicas (Akt total e fosforilada e GSK-3 β total) e a GSK-3 β fosforilada no neocórtex dos animais submetidos ao modelo do *kindling* por PTZ

Variáveis dependentes (desfecho)	Variáveis preditoras associadas independentemente ao desfecho	Tipo de correlação (+ ou -)
p-GSK-3 β no neocórtex	t-Akt no neocórtex	+
	p-Akt no neocórtex	+

Nesta tabela são mostradas as variáveis que são independentemente preditoras da variação da GSK-3 β fosforilada no modelo do *kindling* por PTZ. Também é mostrado o tipo de correlação, positiva ou negativa, entre as variáveis analisadas. * $p < 0,05$ pela regressão linear múltipla.

5. DISCUSSÃO

Embora o modelo do PTZ seja amplamente utilizado em pesquisas na área da epileptologia, nossos resultados são pioneiros em mostrar a associação do fenômeno de *kindling* e moléculas de sinalização celular como as MAPKs, a Akt e a GSK-3 β no neocórtex e no hipocampo de camundongos.

A indução de uma crise convulsiva única por PTZ ou injeção de uma dose única subconvulsivante de PTZ em camundongos não acarretaram mudanças duradouras significativas nos níveis de MAPKs, de Akt e de GSK-3 β no neocórtex e no hipocampo 48 horas após o término da crise convulsiva (minutos após a estimulação). Já o desenvolvimento do *kindling* induzido por PTZ induz modificações complexas nos níveis de fosforilação de diferentes MAPKs, de Akt e de GSK-3 β tanto no neocórtex como no hipocampo de camundongos, e estas modificações são variáveis de acordo com a estrutura cerebral e as proteínas cinases analisadas. Os achados sugerem fortemente que as modificações observadas nos níveis de fosforilação de MAPKs, de Akt e de GSK-3 β em animais submetidos ao modelo do *kindling* induzido por PTZ não sejam devido a um efeito biológico prolongado da última dose de PTZ ou da última crise convulsiva *per se*, mas sim por modificações neuroquímicas mais duradouras, tendo em vista que essas proteínas cinases não alteraram no protocolo de PTZ dose única. Outro ponto importante a ser considerado é o fato de que as modificações variam de acordo com as estruturas analisadas, a resistência e a progressão do *kindling* por PTZ.

Em nosso estudo foi observado uma diminuição da ativação de ERK1/2 no neocórtex de animais com uma progressão mais rápida do *kindling* por PTZ (4, 6 e 7 dias com crise convulsiva) e um aumento na ativação de ERK1 no hipocampo de animais com uma progressão mais lenta do *kindling* por PTZ (1 a 3 dias com crise convulsiva) após 48 h da última crise convulsiva.

A ativação de ERK está envolvida em várias formas de plasticidade sináptica, incluindo a potenciação de longa duração (LTP), processos de aprendizagem e memória dependentes do hipocampo, bem como na regulação da excitabilidade neuronal (Walz *et al.*, 1999; Bonan *et al.*, 2000; Sweatt, 2004; Thomas & Huganir, 2004). A plasticidade dependente da ativação de ERK pode estar envolvida no processo epileptogênico em humanos. Por exemplo, foi recentemente demonstrada uma ativação persistente de ERK1/2 associada com o

aumento da densidade sináptica na zona de início ictal em comparação com as regiões ressecadas próximas que não produzem convulsões (Beaumont *et al.*, 2012). Embora este estudo não indique uma relação de causa e efeito entre a ERK1/2 e seus substratos (genes de transcrição dependentes da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc, CREB) com processo de epileptogênese, foi demonstrada uma clara relação espacial entre a ativação de ERK1/2 e a provável zona epileptogênica no neocórtex humano documentada por electrocorticografia crônica (Beaumont *et al.*, 2012).

Recentemente, o nosso grupo demonstrou a ativação de ERK1/2 no hipocampo de ratos no período agudo (1 a 12 h), mas não no período crônico, após o estado epiléptico induzido por pilocarpina (Lopes *et al.*, 2012). A ativação de ERK1/2 no hipocampo foi também relatada por outros autores utilizando a metodologia de imunohistoquímica durante o período agudo e latente do estado epiléptico induzido pela pilocarpina (Garrido *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2008). A ativação de ERK1/2 também foi observada no hipocampo após 0,5 h, 3 h e 5 h da administração do ácido cáinico (Jeon *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2008; de Lemos *et al.*, 2010) sugerindo que estas modificações na ERK1/2 não são específicas para o modelo do estado de mal epiléptico induzido pela pilocarpina. No modelo de epilepsia do lobo temporal mesial induzido pela pilocarpina, ocorre uma evolução espontânea tipo *kindling* durante o período “sub-crônico” (7 a 22 dias após o estado de mal epiléptico). Uma vez que o estágio 5 de Racine é atingido neste modelo, a intensidade das convulsões subsequentes se mantem igual ou superior ao estágio 3 de Racine, sendo mais frequentemente do estágio 4 ou 5 (Cavalheiro *et al.*, 1991). Estes resultados sugerem uma coincidente ativação de ERK no hipocampo no início do processo espontâneo de *kindling* com um posterior retorno ao estado basal, quando o *kindling* está completamente instalado.

No neocórtex, semelhante ao hipocampo, a ativação de ERK também aumentou na fase aguda do modelo de pilocarpina (Lopes *et al.*, 2012) retornando aos níveis normais durante o período latente (1 a 5 dias após o estado de mal epiléptico) e no período de crônico. O padrão de ativação da ERK1/2 nas estruturas envolvidas ao longo do tempo no modelo do *kindling* por PTZ difere do observado no processo de *kindling* espontâneo no modelo da pilocarpina. A ativação de ERK1/2 não se alterou no neocórtex e no hipocampo de animais resistentes ao *kindling* por PTZ, e aumentou no hipocampo de animais com uma progressão mais lenta do *kindling* por PTZ (1 a 3 dias com crise

convulsiva). Curiosamente, a ativação de ERK1/2 diminuiu no neocórtex dos animais com uma progressão mais rápida do *kindling* por PTZ (mais de 4 dias com crise convulsiva). Estes resultados indicam que a ativação de ERK1/2 pode apresentar perfis diferentes no neocórtex e no hipocampo na resistência ou sensibilidade ao *kindling* por PTZ.

Uma redução sustentada (mais de 6 h) na fosforilação de ERK1/2 pode estar relacionada com neuroproteção, considerando que a magnitude e duração da atividade de ERK1/2 pode estar envolvida com eventos pró-apoptóticos (Stanciu, 2000; Lesuisse & Martin, 2002; Luo & DeFranco, 2006). A partir disso, podemos sugerir que, em nosso estudo, o aumento da atividade da ERK1 no hipocampo após 48 h da crise convulsiva nos animais que tiveram 1 a 3 dias com crises convulsivas pode estar associado com efeitos pró-apoptóticos desta proteína cinase. No neocórtex, a diminuição sustentada da ERK1/2 após 48 h da crise convulsiva nos grupos 4, 6 e 7 dias com crises convulsivas poderia estar associada a uma ação mais pronunciada de proteínas fosfatases ou menor atividade de sinais extracelulares ativadores da via de ERK1/2 ou mesmo ambos. Embora incerto o mecanismo dessa menor atividade de ERK1/2 nesse caso, deve ser considerado a possibilidade de que esse evento poderia participar de respostas neuroprotetoras compensatórias ou de plasticidade envolvidas com o desenvolvimento da epileptogênese.

Os níveis de ativação de JNK1/2 no neocórtex não foram significativamente afetados pelo *kindling* por PTZ em nosso estudo. Por outro lado, a ativação de JNK2, mas não de JNK1, no hipocampo, mostrou um padrão em forma de U invertido semelhante à ativação observada na ERK1 nesta estrutura, com aumento na ativação nos animais que apresentaram de 1 a 3 dias com crise convulsiva e níveis de ativação semelhantes aos controles em camundongos resistentes ao *kindling* por PTZ e em camundongos com uma progressão mais rápida do *kindling* por PTZ (mais de 4 dias com crise convulsiva). A JNK está envolvida em muitos processos biológicos, tais como a diferenciação, a apoptose e o estresse celular e a neurodegeneração, mas também estão envolvidas na neuroplasticidade e na regeneração celular (Kuan *et al.*, 1999; Bevilaqua *et al.*, 2003; Waetzig *et al.*, 2006; Dijke *et al.*, 2007). As diferentes isoformas de JNK podem modular diferentes respostas, a JNK1 parece ser mais ativa no estado basal e JNK2 e/ou JNK3 parecem possuir uma maior participação nos mecanismos de morte celular (Brecht *et al.*, 2005; Waetzig *et al.*, 2006; de Lemos *et al.*,

2010). Alguns autores também mostraram um aumento da ativação de JNK1/2 na sub-região CA1 do hipocampo após o *kindling* elétrico, correlacionando-a com a morte neuronal (Cole-Edwards *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010) e com gliose reativa (Cole-Edwards *et al.*, 2006).

A máxima ativação de JNK no hipocampo de animais tratados com PTZ ocorre 1 h após a indução da crise convulsiva, comparado com 0,5 h e 2 h (Morgan *et al.*, 2006). Outro estudo mostrou que o aumento de JNK1 no neocórtex e no hipocampo atinge seu máximo entre 6 e 12 horas após a convulsão induzida por ácido cáínico, comparado com intervalos de 1 h a 72 h (Mielke *et al.*, 1999). A atividade de JNK também foi aumentada no neocórtex e no hipocampo após 2 semanas do tratamento com ácido cáínico, apesar de ter diminuído após 3 h da administração da droga (Hsieh *et al.*, 2007). Recentemente, nosso grupo mostrou uma diminuição da ativação de JNK2/3 no neocórtex e no hipocampo 3 h após a indução estado de mal epiléptico, bem como durante o período crônico do modelo de epilepsia (Lopes *et al.*, 2012).

Em nosso estudo observamos o aumento de JNK2 no hipocampo dos animais que apresentaram de 1 a 3 dias com crises convulsivas, sendo a mesma região e grupo de animais em que ocorreu o aumento de atividade de ERK1. Embora ERK possa participar de mecanismos neuroprotetores e neuroplasticidade, tem sido relatado que o aumento sustentado da atividade dessa enzima pode estar associado a efeitos pró-apoptóticos (Stanciu, 2000; Lesuisse & Martin, 2002; Luo & DeFranco, 2006), a JNK2 também pode estar envolvida com mecanismos de morte celular e neuroplasticidade. Já com o decorrer da progressão do *kindling*, o quadro observado parece estar associado a respostas neuroprotetoras compensatórias ou de plasticidade envolvidas com o desenvolvimento da epileptogênese. Dessa forma esta associação pode ter vários significados, que incluem mecanismos compensatórios, de morte celular ou de modificação mais duradoura da plasticidade neuronal importante no processo do desenvolvimento do *kindling* por PTZ.

Os níveis de ativação de p38^{MAPK} não foram alterados no protocolo de *kindling* por PTZ no neocórtex e no hipocampo de camundongos em nosso estudo. Hsieh *et al.* (2007) também não encontraram alterações na ativação de p38^{MAPK} no neocórtex e no hipocampo após tratamento com ácido cáínico. Em contraste, uma diminuição na ativação de p38^{MAPK} foi observada 10 dias após o tratamento com ácido cáínico em outro estudo (Mielke *et al.*, 1999), bem como no modelo da pilocarpina, no qual ocorreu em associação

com um pequeno aumento na expressão total de p38^{MAPK} (Jung *et al.*, 2010). Em nosso estudo anterior, a p38^{MAPK} foi ativada 1 h e 12 h após a indução do estado de mal epiléptico pela pilocarpina no neocórtex e no hipocampo, mas retornou aos níveis basais no período crônico (50 dias) em ambas as estruturas. Estes resultados podem indicar que a p38^{MAPK} não está associada à manutenção do *kindling* por PTZ, bem como às convulsões espontâneas observadas no período crônico do modelo da pilocarpina (Lopes *et al.*, 2012).

A grande variedade de resultados na literatura relacionando as MAPKs com as crises convulsivas se deve ao fato de existirem diferentes protocolos para induzir essas crises, os quais possuem características eletrofisiológicas, comportamentais e estruturais bem específicas, e também ao tempo variável em que os animais foram submetidos à eutanásia após a crise convulsiva, bem como a estrutura cerebral analisada. Portanto, nosso resultado é pioneiro quando se correlaciona as MAPKs e o modelo do *kindling* por PTZ, 48 h após a última crise convulsiva em camundongos.

Não há na literatura (ao menos do nosso conhecimento) nenhum estudo mostrando as alterações nas vias de sinalização dependentes de MAPKs ou de outras moléculas de transdução de sinal no modelo do *kindling* por PTZ levando em conta simultaneamente a progressão do *kindling* e a latência para o surgimento da crise convulsiva no último dia de estimulação. Através da regressão linear múltipla foi mostrado que os níveis de ERK1 fosforilada, de JNK1 fosforilada, de JNK2 fosforilada e de JNK1 total no hipocampo foram independentemente associadas ao número de dias com crise convulsiva durante os 8 dias de estimulação com PTZ. Os níveis destas cinases explicam 75% da variação no número de dias com crise convulsiva dos animais. Somente os níveis de p38^{MAPK} do neocórtex e a latência para o primeiro dia com crise convulsiva foram significativamente associados com a latência para a última crise convulsiva pela regressão linear múltipla, os quais explicam em 64% da variação da latência para o surgimento da crise no último dia de estimulação.

A avaliação da associação entre a progressão do *kindling* ou da latência para a última crise convulsiva e a ocorrência de modificações neuroquímicas realizada através de análises por regressão linear múltipla é uma abordagem inédita na literatura. Esta análise permite controlar a distribuição das variáveis neuroquímicas de forma simultânea, determinando-se o grau de associação independente das mesmas e o desfecho de interesse (progressão do *kindling* ou latência

para a ocorrência da última crise). Nesta abordagem optamos por excluir os animais que não haviam apresentado crises convulsivas, sendo uma analogia ao grupo de pacientes que apresentam a epilepsia instalada do ponto de vista translacional, já que, por definição, o *kindling* só está instalado quando os animais apresentarem ao menos dois dias com crise convulsiva.

Neste estudo foi visto que diferentes MAPKs estão independentemente associadas com a progressão do *kindling* e a latência para a ocorrência da crise convulsiva desencadeada pela última estimulação. A fosforilação das proteínas cinases ERK1 e JNK2 no hipocampo foram negativamente associadas com a progressão do *kindling*, ou seja, quanto mais dias com crise convulsiva ocorrem, menor a ativação de ERK1 e JNK2 no hipocampo, reforçando a ideia de que existe um aumento na atividade destas proteínas cinases no hipocampo no início do processo de epileptogênese. O conteúdo total de JNK1, bem como de sua forma fosforilada, no hipocampo foram positivamente associados com a progressão do *kindling*. O aumento na quantidade e atividade da JNK1 com a ocorrência de dias com crise convulsiva subsequentes pode ser um mecanismo neuroprotetor desenvolvido ao longo da instalação do *kindling* (Brecht *et al.*, 2005). A única proteína cinase que se associou à latência para o último dia com crise convulsiva (limiar para ictogênese) foi a p38^{MAPK} do neocórtex. Esta proteína cinase mostrou-se positivamente associada à latência para o último dia com crise convulsiva, ou seja, animais que possuíram uma maior latência para o último dia com crise convulsiva, apresentaram uma maior ativação de p38^{MAPK} do neocórtex.

Foi possível determinar de forma bastante satisfatória as variações nos níveis de MAPKs no neocórtex e no hipocampo que são capazes de predizer (biomarcadores) a variação na gravidade da progressão da epileptogênese (progressão do *kindling*) e do limiar (latência) para ocorrência da crise convulsiva no último dia de estimulação após a instalação do *kindling*. De maneira interessante, houve uma diferença substancial entre o modelo preditivo da progressão das crises convulsivas e da latência para o último dia com crise convulsiva, o que sugere a possibilidade de uma dissociação nos mecanismos neuroquímicos básicos envolvidos nos dois processos quando consideramos o envolvimento das MAPKs. Este achado pode ser um forte indício para justificar o fato de que o desenvolvimento de fármacos que modifiquem o limiar para ocorrência de crises epiléticas (impedir a ictogênese) não seja capaz de reverter o processo de

epileptogênese instalado ou em andamento, no caso de tratamentos profiláticos em pacientes com risco para desenvolver epilepsia (ex. vítimas de trauma craniano).

O conjunto de resultados apresentados no terceiro capítulo desta tese demonstra que não existe uma mudança significativa nos níveis de Akt fosforilada e total no neocórtex e no hipocampo dos animais submetidos ao modelo do *kindling* por PTZ quando estratificados de acordo com o número de crises convulsivas. Também não foram observadas modificações significativas nos níveis de GSK-3 β total e fosforilada no hipocampo dos animais submetidos a este protocolo experimental. Já os níveis de GSK-3 β em sua forma fosforilada (inativa) estão significativamente modificados no neocórtex dos animais submetidos ao tratamento com repetidas doses de PTZ. Estas modificações não podem ser atribuídas a mudanças nos níveis totais da enzima, ou em decorrência de efeitos biológicos residuais da última crise provocada pelo PTZ ou por um efeito biológico prolongado pela droga, uma vez que os níveis de fosforilação desta enzima não estão alterados em animais submetidos ao protocolo de PTZ dose única.

De maneira importante, os níveis neocorticais da GSK-3 β fosforilada estiveram aumentados nos animais e que não apresentaram crises convulsivas ou a tiveram em uma baixa incidência (no máximo 3 dias com crise convulsiva) quando comparados ao grupo controle, já em animais que tiveram mais dias com crise convulsiva (mais de 4 dias) apresentaram uma diminuição desta proteína cinase em relação aos animais resistentes ao *kindling* por PTZ ou que tiveram poucos dias com crise convulsiva (até 3 dias). Outro estudo relatou um aumento nos níveis e na fosforilação de GSK-3 β três dias após o estado de mal epilético induzido pela pilocarpina em ratos (Lee *et al.*, 2012), demonstrando que os níveis de fosforilação de GSK-3 β podem ser diferentemente afetados com protocolos distintos de indução da epilepsia em modelos animais.

Com a análise por regressão logística linear múltipla foi possível demonstrar uma associação negativa entre os níveis corticais da GSK-3 β fosforilada e a progressão do *kindling*, ocorrendo de forma independente das demais variáveis incluídas no modelo. O modelo também mostrou que os níveis de GSK-3 β fosforilada no neocórtex e Akt fosforilada no hipocampo se mostram independentemente associados de forma negativa e positiva, respectivamente, à latência para a ocorrência da crise convulsiva no último dia de estimulação.

Sabe-se que a Akt é uma enzima que inativa a GSK-3 β através da fosforilação de um resíduo de Ser9 (Cross *et al.*, 1995) e que, inativando a GSK-3 β , possibilita eventos como o crescimento, a proliferação, metabolismo e sobrevivência celular, a plasticidade sináptica, o aprendizado e a memória (Datta *et al.*, 1999; Brazil *et al.*, 2004; Chong *et al.*, 2005; Hemmings & Restuccia, 2012). Em nosso estudo foi observada uma associação significativa e independente entre os níveis de Akt total e fosforilada e os níveis de GSK-3 β fosforilada no neocortex. O aumento na fosforilação de GSK-3 β também não foi acompanhado por mudanças nos níveis de fosforilação de Akt, como em estudos com animais nocaute para o receptor de dopamina D2 (D2R-/-), onde foi observado um aumento na atividade de GSK-3 β (desfosforilação) no hipocampo de ratos 24 h após a administração de ácido cáinico, sem alterações na atividade de Akt, de p38^{MAPK} (Tripathi *et al.*, 2010) e de proteínas *Dishevelled* (Dvl) (Dunleavy *et al.*, 2013), sugerindo uma via alternativa de ativação de GSK-3 β .

Em outro estudo foi demonstrado que o aumento do brotamento de fibras musgosas, um fenômeno patológico comum na epilepsia, acompanhou-se de aumento na severidade das convulsões e a amplitude e a frequência de correntes pós-sinápticas excitatórias em ratos submetidos ao modelo de *kindling* por PTZ (Huang *et al.*, 2013). A expressão do RNAm e da proteína GSK-3 β , bem como sua atividade, aumentaram significativamente de 3 dias para 4 semanas após a injeção de PTZ inicial no modelo de *kindling*, o que foi correlacionado com um aumento na fosforilação da proteína tau, a qual está associada aos microtúbulos facilitando o transporte axonal, crescimento de neuritos e alongamento axonal, sugerindo que a GSK-3 β pode estar envolvida com o brotamento de fibras musgosas no hipocampo através da fosforilação da proteína tau em ratos submetidos ao *kindling* por PTZ (Huang *et al.*, 2013). Embora tanto o nosso protocolo de investigação, como o utilizado por Huang e colaboradores (Huang *et al.*, 2013) não permitam estabelecer uma relação de causa e efeito entre a gravidade de instalação do *kindling*, acreditamos que esta inativação da GSK-3 β no neocortex possa estar envolvida tanto com uma menor progressão do *kindling* por PTZ como na diminuição da latência para a ocorrência da crise convulsiva no último dia de estimulação neste modelo.

Ademais, neste estudo foram demonstrados os efeitos do modelo animal de epilepsia do *kindling* por PTZ nas proteínas de sinalização celular ERK1/2, JNK1/2/3, p38^{MAPK}, Akt e GSK-3 β , bem como suas associações independentes com a progressão do *kindling* por PTZ e a

latência para o último dia com crise convulsiva. As análises realizadas são inéditas na literatura, pois, diferentemente dos trabalhos existentes, os animais que foram submetidos ao modelo do *kindling* por PTZ foram divididos em grupos estratificados de acordo com a quantidade de dias com crises convulsivas e os animais resistentes ao modelo também foram incluídos no estudo. Outra abordagem inédita foi a utilização da regressão linear múltipla para avaliar as possíveis variáveis independentemente associadas à progressão do *kindling* por PTZ e a latência para o último dia com crise convulsiva.

6. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

– Os níveis de MAPKs (ERK1/2, JNK1/2/3 e p38^{MAPK}), de Akt e de GSK-3 β totais e fosforiladas no neocórtex e no hipocampo não foram significativamente afetados 48 horas após uma única dose, subconvulsivante ou convulsivante, de PTZ em camundongos.

– Os níveis de ERK1/2, JNK1/2/3 e p38^{MAPK}, Akt e GSK-3 β totais no neocórtex e no hipocampo de camundongos machos não foram modificados pelo *kindling* por PTZ.

– Os níveis de MAPKs fosforiladas permaneceram inalterados em camundongos machos submetidos ao modelo de *kindling* por PTZ e que não apresentaram crises convulsivas.

– Os níveis de JNK2 fosforilada, mas não de JNK1 fosforilada, no hipocampo, aumentaram em animais que apresentaram poucos dias com crise convulsiva (1 a 3 dias), e permaneceram inalterados nos animais que apresentaram mais de três dias com crise convulsiva.

– Os níveis de ERK1/2 fosforiladas diminuíram no neocórtex e aumentaram no hipocampo de animais com 1 a 4 dias com crise convulsiva, e permaneceram inalterados nos animais que tiveram mais de 4 dias com crise convulsiva.

– Uma vez que o *kindling* esteja estabelecido (mais de dois dias com crise convulsiva), é possível identificar um padrão linear distinto dos níveis MAPKs independentemente associadas à progressão do *kindling* e à latência para o último dia com crise convulsiva no neocórtex e no hipocampo.

– Nos animais com completa instalação do *kindling* por PTZ, há uma associação negativa dos níveis de ERK1 fosforilada e JNK2 fosforilada e uma associação positiva dos níveis de JNK1 total e JNK1 fosforilada no hipocampo com o número de dias com crise convulsiva de durante o *kindling* por PTZ. Nos mesmos animais, existe uma associação positiva entre o nível de p38^{MAPK} fosforilada no neocórtex e a latência para a ocorrência da crise convulsiva na última estimulação com PTZ.

– Os níveis de fosforilação da GSK-3 β aumentaram progressivamente no neocórtex, mas não no hipocampo, dos animais que apresentaram entre 0 a 3 dias com crise convulsiva quando comparados ao controle. Estes níveis de fosforilação caíram para níveis inferiores aos animais resistentes e com 1 a 3 dias com crises convulsivas nos animais que apresentaram quatro ou mais dias com crise convulsiva.

– 85% da variação na progressão do *kindling* por PTZ é explicável pela latência para a ocorrência da crise convulsiva no primeiro e no último dia de estimulação e pelos níveis de GSK-3 β fosforilada no neocórtex.

– 87% da variação na latência para o último dia com crise convulsiva é explicada pela latência para o primeiro dia com crise convulsiva, progressão do *kindling*, níveis de GSK-3 β fosforilada no neocórtex e Akt fosforilada no hipocampo.

– Os níveis de GSK-3 β fosforilada no neocórtex se correlacionaram significativamente com os níveis de Akt total e Akt fosforilada nesta estrutura.

– Os achados sugerem uma dissociação entre nos níveis cerebrais regionais de MAPKs, de Akt e de GSK-3 β associados à epileptogênese (progressão do *kindling*) e ao limiar (latência) para a ocorrência da crise convulsiva em animais sensibilizados pelo PTZ.

7. CONCLUSÕES

No presente estudo foram demonstradas alterações nas proteínas de sinalização celular, ERK1/2, JNK1/2/3, p38^{MAPK}, Akt e GSK-3 β , no neocortex e no hipocampo de animais submetidos ao modelo do *kindling* por PTZ. A análise multivariada por regressão logística múltipla mostrou-se uma ferramenta útil para abordar a dissociação dos processos associados à epileptogênese e ictogênese no modelo do *kindling* por PTZ em camundongos, auxiliando na compreensão dos mecanismos independentes envolvidos nos dois processos. Embora o desenho experimental utilizado não permita estabelecer uma relação de causa e efeito entre os biomarcadores e os desfechos de interesse, ele permitiu identificar alvos específicos para intervenções diferenciadas para a epileptogênese e a ictogênese. A utilização de fármacos capazes de modular seletivamente a ativação de ERK1/2, de JNK1/2/3, de p38^{MAPK}, de Akt e de GSK-3 β é um passo importante na tentativa de interferir seletivamente nos processos de epileptogênese e de ictogênese. Esta abordagem pode ser útil para atender a demanda clínica através do desenvolvimento de fármacos eficazes não apenas para o controle das crises epiléticas, mas também capazes de modificarem o curso da doença, prevenindo ou revertendo a epileptogênese.

8. ANEXO 1 – ARTIGO SUBMETIDO

Submetido à Revista Neuroscience

Effects of pentylenetetrazole kindling on mitogen activated protein kinases (MAPKs) levels in neocortex and hippocampus of mice

Juliana Ben¹, Paulo Alexandre de Oliveira², Filipe Marques Gonçalves³,
Tanara Vieira Peres¹, Filipe Carvalho Matheus², Rodrigo Bainy Leal^{1,3},
Roger Walz^{1,4}, Rui Daniel Prediger^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Neurociências, ²Departamento de Farmacologia, ³Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil, ⁴Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário (HU), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

*** Corresponding author:**

Rui Daniel Prediger, PhD

Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Farmacologia, CCB/Bloco D, Florianópolis 88049-900, SC, Brazil

Tel.: +55 48 3721 9764, ramal 223; fax: +55 48 3337 5479

E-mail address: ruidsp@hotmail.com

ABSTRACT

The epileptogenesis process involves cell signaling events associated with neuroplasticity. The mitogen activated protein kinases (MAPKs) integrate signals originating from a variety of extracellular stimuli and may regulate cell differentiation, survival, cell death and synaptic plasticity. Here we compared the total and phosphorylated MAPKs (ERK1/2, JNK1/2 and p38^{MAPK}) levels in the neocortex and hippocampus of adult Swiss male mice quantified by western blotting analysis 48 hours after the last injection of the pentylenetetrazole (PTZ) kindling protocol (35 mg/kg, i.p., on alternated days, with a total of 8 injections). The total levels of all MAPKs and the phospho-p38^{MAPK} in the neocortex and hippocampus were not affected by the PTZ injections. The MAPKs phosphorylation levels remain unaltered in the PTZ-treated animals absent of convulsive seizures. The phospho-JNK2 phosphorylation, but not the phospho-JNK1, was increased in the hippocampus of PTZ-treated animals showing 1 to 3 days with convulsive seizures, whereas no significant changes were observed in those animals with more than 3 days with convulsive seizures. The phospho-ERK1/2 phosphorylation decreased in the neocortex and increased in the hippocampus of animals with 1 to 4 days with convulsive seizures and became unaltered in animals that showed convulsive seizures for more than 4 days. These findings indicate that resistance to PTZ kindling is associated to unaltered ERK1/2, JNK1/2 and p38^{MAPK} phosphorylation levels in the neocortex and hippocampus. Moreover, when the PTZ kindling-induced epileptogenesis manifests behaviorally, the activation profile of the different MAPKs sub-families shows a variable and non-linear pattern in the neocortex and hippocampus.

Keywords: epilepsy, kindling, pentylenetetrazole, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), hippocampus, neocortex

Abbreviations: pentylenetetrazole (PTZ), mitogen-activated protein kinases (MAPKs), extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2), c-Jun-N-terminal kinases 1-3 (JNK1/2/3), p38 kinases a-d (p38^{MAPK}a/b/c/d).

1. Introduction

Epilepsies are characterized by recurrent spontaneous seizures due to abnormal hyper synchronic neuronal hyperactivity in the brain (Dichter & Ayala, 1987; Meldrum *et al.*, 1999; Coulter, 2001). The antiepileptic drugs enhance the threshold for seizures without a significant antiepileptogenic effect (Galanopoulou *et al.*, 2012) and about 30% of patients with epilepsy remain with seizures even considering all the current pharmacological options (Berg, 2004). A better understanding of the epileptogenesis processes using animal's models may help to identify targets for new and more effective epilepsy treatments. The pentylenetetrazole (PTZ) acts blocking the chloride ionophore of the subtype A of gamma-aminobutyric acid (GABA_A) receptor by interacting with the picrotoxin site of this receptor (Huang *et al.*, 2001). The PTZ kindling model consists of progressive and persistent intensification of seizure susceptibility after repeated sub-threshold stimulation with PTZ, resulting in generalized seizures (Racine *et al.*, 1972). The PTZ model is useful to investigate basic mechanisms related to resistance and sensibility to epileptogenesis in rodents (Walz *et al.*, 1999; Bonan *et al.*, 2000) which involves acute and chronic seizure-related effects including enzymatic changes, altered neurotransmitter release and modification of receptor or ion channels expression or functions which require a complex cellular biochemical interaction network of signal transduction molecules (Bonan *et al.*, 2000; Ekonomou *et al.*, 2001; Zhang & Wong, 2012).

The mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are a group of serine-threonine kinases that amplify and integrate signals originating from a variety of extracellular stimuli and may regulate cell differentiation, survival and death and synaptic plasticity (Thomas & Huganir, 2004; Waetzig & Herdegen, 2004; Lee & Son, 2009). They consist of three main kinases subfamilies, the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2), the c-Jun-N-terminal kinases 1-3 (JNK1/2/3) and the p38^{MAPK} (Chang and Karin, 2001; Thomas and Huganir, 2004).

All these signaling enzymes are involved in the synaptic plasticity events and changes in their activities may be associated with physiologic and pathologic processes including propensity or resistance to epileptogenesis and modulation of seizures threshold. In fact, a time and structure-dependent involvement of MAPKs has been described in chronic models of epilepsy including pilocarpine (Lopes *et al.*, 2012),

kainic acid models (Mielke *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 2007; de Lemos *et al.*, 2010) and electric kindling (Cole-Edwards *et al.*, 2006), as well as in acute models like PTZ-induced seizures (Morgan *et al.*, 2006) and electroconvulsive shock (Kang *et al.*, 2002). The possible associations among the MAPKs and the resistance or propensity to PTZ kindling remain to be investigated.

Therefore, we investigated the profile of the total and phosphorylated ERK1/2, JNK1/2/3 and p38^{MAPK} levels in the neocortex and hippocampus of mice according to their variable degrees of PTZ kindling progression (i.e., days with convulsive seizures).

2. Experimental Procedure

2.1 Animals

Experiments were conducted using male Swiss mice, with 8 - 12 weeks of age (n = 49), weighing 30 - 60 g at the beginning of the experiments, supplied by the animal facility of the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, Brazil). The animals were kept in collective cages (15 animals per cage) and maintained in a room under controlled temperature (21 ± 2 °C) and 12 h light cycle (lights on 7:00 a.m.), with free access to food and water. All procedures were conducted between 9 a.m. and 12 a.m. Efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. The procedures used in the present study complied with the guidelines on animal care of the UFSC Ethics Committee on the Use of Animals (protocol PP00830), which follows the “Principles of laboratory animal” from NIH.

2.2 PTZ kindling and experimental design

In the PTZ kindling model (Fig. 1A), a subconvulsive dose of PTZ (35 mg/kg, i.p., n = 32) was administered on alternate days for 16 days (8 injections). Animals were observed for 30 min, and seizure severity was classified according to the following scale: 1, facial clonus; 2, head nodding; 3, myoclonic jerks; 4, rearing/falling seizures; 5, running/bouncing seizures (Racine, 1972a, 1972b; Racine *et al.*, 1972; Walz *et al.*, 1999; Lüttjohann *et al.*, 2009). Seizure intensity increased with each administration until animals reached Racine stage 4 or 5 or died. Seizure severity and mortality were recorded every day after each

observation. Controls animals receive saline (10 ml/kg, i.p., n = 4) on alternate days (8 injections).

The kindling progression was determined by the number of days with convulsive seizures (Racine stage 4 or 5) developed during the protocol. Animals showing 8 days with convulsive seizures had the maximal kindling progression.

The neocortex and hippocampus were dissected 48 h after the last injection of saline or PTZ for proteins analysis. The total and phosphorylated MAPKs (ERK1/2, JNK1/2/3, p38^{MAPK}) levels were analyzed by western blotting.

To exclude the possible residual effects of PTZ or epileptic seizure *per se* on the biochemical variables, we investigated the total and phosphorylated MAPKs (ERK1/2, JNK1/2/3, p38^{MAPK}) levels 48 h after singles subconvulsive (35 mg/kg, i.p.) or convulsive (60 mg/kg, i.p.) PTZ doses (n = 5 and 4, respectively) and compared with control animals treated with saline (n = 4) (Fig. 1B).

2.3 Reagents

HEPES, Triton X-100, SDS, acrylamide, bis-acrylamide, were obtained from GE Healthcare Life Science (Piscataway, NJ, USA). Glycine, Tris, TEMED, β -mercaptoethanol were obtained from Amresco Life Science (Solon, OH, USA). Bovine serum albumin (BSA) was obtained from Inlab (São Paulo, SP, Brazil). Immobilon nitrocellulose and goat anti-rabbit IgG HRP (horseradish peroxidase) were obtained from the Millipore (Temecula, CA, USA). Pentylentetrazole (PTZ), ammonium persulfate (APS), rabbit anti-total-ERK1/2, anti-total-JNK1/2, anti-phospho and anti-total-p38^{MAPK} were purchased from the Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Rabbit anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-JNK1/2/3, LumiGLO reagent (luminol chemiluminescent substrate) were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Mouse anti- β actin as well goat anti-mouse IgG HRP conjugated antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology. All other reagents were of analytical grade.

2.4 Western blot analysis

For quantification of MAPKs activation Western blot analysis was performed as previously described by (Leal *et al.*, 2002; Cordova *et al.*, 2004; Posser *et al.*, 2007). Animals were euthanized by decapitation,

brains were collected and neocortex and hippocampus were dissected (4°C), placed in liquid nitrogen and then stored at -80°C until use. Samples were prepared as previously described by Oliveira and colleagues (2008). Briefly, samples were mechanically homogenized in 400 µl of Tris 50 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0.1 mM, Na3VO4 2 mM, Triton X-100 1%, glycerol 10%, Sigma Protease Inhibitor Cocktail (P2714). Lysates were centrifuged (10,000 x g for 10 min, at 4°C) to eliminate cellular debris. The supernatants were diluted 1/1 (v/v) in Tris 100 mM pH 6.8, EDTA 4 mM, SDS 8% and boiled for 5 min. Thereafter, sample dilution (40% glycerol, 100 mM Tris, bromophenol blue, pH 6.8) in the ratio 25:100 (v/v) and β mercaptoethanol (final concentration 8%) were added to the samples. Protein content was estimated by the method described by Peterson (1977). The same amount of protein (70 µg per lane) for each sample was electrophoresed in 10% SDS-PAGE mini-gels and transferred to nitrocellulose membranes using a semidry blotting apparatus (1.2 mA/cm²; 1.5 h). To verify transfer efficiency process, gels were stained with Coomassie blue and membranes with Ponceau S.

The membranes were blocked with 5% skim milk in TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5). The phosphorylated and total forms of MAPKs were detected after overnight incubation with specific antibodies diluted in TBS-T containing BSA 2% in the dilutions of 1:1000 (anti-phospho-JNK1/2/3, anti-phospho-p38^{MAPK}), 1:2000 (anti-phospho-ERK1/2), 1:5000 (anti-total-JNK1/2) 1:10000 (anti-total-p38^{MAPK}) and 1:40000 (anti-total-ERK1/2). Moreover, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit for detection of phosphorylated and total forms of each MAPK, by the reactions developed by chemiluminescence substrate (LumiGLO). All blocking and incubation steps were followed by three times washing (5 min) with TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1%, pH 7.5). All membranes were incubated with mouse anti-β-actin (1:2000) antibody to verify that equal amounts of proteins were loaded on the gel. The phosphorylation (activation) level of MAPKs were determined as a ratio of optical densitometry (OD) of phosphorylated band/OD of total band (Posser *et al.*, 2007). The bands were quantified using the Scion Image® software.

The antibody against ERK1/2 detected two bands, one at approximately 44 kDa and the second at approximately 42 kDa, corresponding respectively to the two ERK isoforms, ERK1 and ERK2. Anti-p38^{MAPK} detected a single band of approximately 38 kDa, anti-JNK

1/2/3 detected two bands, one at approximately 54 kDa and the second at approximately 46 kDa, corresponding respectively to the three JNK isoforms, JNK2/3 and JNK1. The anti- β -actin antibody detected a single band of approximately 45 kDa.

2.5 Statistical analysis

All the continuous variables analyzed showed a normal distribution in the one sample Kolmogorov-Smirnov test. Comparisons of MAPKs levels (total and phosphorylated) in the brain structures (neocortex and hippocampus) among controls and animals groups treated with PTZ were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc test.

3. Results

The figures 2A,B, 3A,B, 4A,B show the MAPKs activation (phosphorylation) levels in the neocortex of controls and PTZ-treated animals stratified according to the number of days with convulsive seizures (Racine 4 or 5) after a total of 8 injections on alternated days. The JNK1, JNK2 and p38^{MAPK} phosphorylation levels did not differ between the controls and PTZ treated animals ($p > 0.62$). There was a variable decrease in the neocortical levels of phospho-ERK1 [$F(5,18) = 6.70$; $p = 0.001$] and phospho-ERK2 [$F(5,18) = 5.18$; $p = 0.004$] in comparison to controls depending on the number of days with convulsive seizures. There were no significant differences ($p > 0.20$) in the total content of all the investigated MAPKs among the controls and PTZ-treated animals (data not shown).

The figures 2C,D, 3C,D, 4C,D illustrate the MAPKs activation (phosphorylation) levels in the hippocampus of controls and PTZ-treated animals stratified according to the number of days with convulsive seizures elicited during the 8 stimulations days. The ERK2, JNK1 and p38^{MAPK} phosphorylation levels did not differ among the controls and PTZ-treated animals ($p > 0.20$). Animals treated with PTZ that displayed 1 to 3 days with convulsive seizures after the 8 days of stimulation showed a significant increase in the hippocampal levels of phospho-ERK1 [$F(5,18) = 3.44$; $p = 0.02$] and phospho-JNK2 [$F(5,18) = 2.92$; $p = 0.04$] in comparison to controls. There was no association between the levels of phospho-ERK1 and phospho-JNK2 in the hippocampus ($r = 0.13$, $p = 0.57$, data not shown). Moreover, no

significant differences ($p > 0.24$) were observed in the total content of all investigated MAPKs in hippocampus among the controls and PTZ-treated animals (data not shown).

The levels of MAPKs in the neocortex and hippocampus determined 48 h after a single subconvulsive (35 mg/kg, i.p.) or a convulsive (60 mg/kg, i.p.) dose of PTZ did not differ from controls ($p > 0.20$, data not shown).

4. Discussion

The present findings show that repetitive subconvulsive PTZ administration (35 mg/kg, i.p., on alternated days, with a total of 8 injections) modulates differentially the neocortical and hippocampal MAPKs (ERK1/2, JNK1/2 and $p38^{\text{MAPK}}$) phosphorylation profile without affecting the total content of these enzymes. The relationship between the sensitivity to kindling induction and these signal transduction molecules are variable according to the investigated MAPKs subfamilies, as well as the brain region analyzed. The current results were not due to confounding bias resulted from residual effects of the last PTZ injection or convulsive seizure per se, since the MAPKs profiles were not affected by single subconvulsive or convulsive PTZ injections.

In our study was shown a decrease in ERK1/2 activation in the neocortex of animals with faster PTZ kindling progression (4, 6 and 7 days with convulsive seizures) and an increase in ERK1 activation in the hippocampus of animals with slower PTZ kindling progression (1 to 3 days with convulsive seizures) after 48 h of the last convulsive seizure.

The ERK activation is involved in several forms of synaptic plasticity, including long-term potentiation (LTP), hippocampal-dependent learning and memory as well as regulation of neuronal excitability (Walz *et al.*, 1999; Bonan *et al.*, 2000; Sweatt, 2004; Thomas & Huganir, 2004). Of high importance, the activity-dependent plasticity related to ERK activation may be involved in the epileptogenic process in humans. For instance, it was recently demonstrated a persistent ERK1/2 activation associated with increased synaptic density in the ictal onset zone in comparison to the nearby resected regions that do not produce seizures (Beaumont *et al.*, 2012). Although this previous study does not indicate a cause-effect relationship between ERK1/2 and its downstream pathway (CREB-dependent transcription genes) with epileptogenesis process, it was

demonstrated a clear spatial relationship between ERK1/2 activation and probable epileptogenic zone in human neocortex documented by chronic electrocorticography (Beaumont *et al.*, 2012).

Recently our group demonstrated by western blotting analysis an ERK1/2 activation in the rat hippocampus 1 to 12 h but not chronically, after the pilocarpine-induced status epilepticus (Lopes *et al.*, 2012). The ERK1/2 activation in the hippocampus during the acute and sub-acute period of pilocarpine-induced status epilepticus were confirmed by other authors using immunoistochemistry methodology (Garrido *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2008). The ERK1/2 activation was also demonstrated in the hippocampus at 0.5 h, 3 h and 5 h after the kainic acid administration (Jeon *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2008; de Lemos *et al.*, 2010) suggesting that it is not specific to the pilocarpine induced status epilepticus model. In the pilocarpine model, a spontaneous kindling-like evolution is took in the "sub-chronic" period (7-22 days after the status epilepticus) and once the Racine satge 5 was reached the subsequent seizures intensity became higher than Racine stage 3, being mostly generalized (Cavalheiro *et al.*, 1991). These findings suggest a coincident ERK activation in the hippocampus earlier in spontaneous kindling process with a subsequent return to baseline when the kindling is fulfilled installed. When the neocortex is evaluated, like in the hippocampus, the ERK levels were also increased in the acute phase of the pilocarpine model (Lopes *et al.*, 2012) returning to normal levels in the latent period (1 to 5 days after the status epilepticus) and chronic periods. The time and structure-dependent ERK1/2 activation in the PTZ kindling differ from those observed in the spontaneous kindling process in the pilocarpine model. The ERK1/2 phosphorylation levels did not change in the neocortex and hippocampus of animals resistant to PTZ kindling, whereas they increased in the hippocampus and decreased in the neocortex of animals with slower PTZ kindling progression (1 to 4 days with convulsive seizures). Interestingly, ERK1/2 activation was not altered in the neocortex and hippocampus of those animals with faster PTZ kindling progression (more than 4 days with convulsive seizures). Taken together, these findings indicate that ERK1/2 may present opposite effects in the neocortex and hippocampus on PTZ kindling resistance or progression.

The JNK1/2 activation in the neocortex was not significantly affected by the PTZ injections. On the other hand, the phospho-JNK2 (p54 kDa), but not the phospho-JNK1, showed a similar inverted U-shaped pattern of activation to that observed for ERK1, with increased

phosphorylation in those animals with 1 to 3 days with convulsive seizures, and similar to controls phosphorylation levels in kindling resistant mice and in mice with faster PTZ kindling progression (more than 4 days with convulsive seizures). However, no significant association was observed between the ERK1 and JNK2 activation in the hippocampus, suggesting that both kinases are functionally independent during PTZ kindling resistance or progression. JNK and ERK are involved in many biological processes, such as cellular differentiation, apoptosis, stress reaction, neurodegeneration, but also involved in neuroplasticity and regeneration (Kuan *et al.*, 1999; Bevilaqua *et al.*, 2003; Waetzig *et al.*, 2006; Dijke *et al.*, 2007). Recently, our group showed a decrease of JNK2/3 activation in the neocortex and hippocampus 3 h after the status epilepticus induction as well as during the chronic period in the pilocarpine model. The JNK isoforms may exhibit different responses, JNK1 is more active in the basal state and JNK2 and/or JNK3 seem to participate in mechanism of cell death (Brecht *et al.*, 2005; Waetzig *et al.*, 2006; de Lemos *et al.*, 2010). Some authors also showed an increase of JNK1/2 activation in the CA1 sub region of the hippocampus after electric kindling, and correlate it with neuronal death (Cole-Edwards *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010) and reactive gliosis (Cole-Edwards *et al.*, 2006).

The p38^{MAPK} activation was not altered in the current PTZ kindling protocol neither in the neocortex nor in the hippocampus. Hsieh *et al.* (2007) also showed no alterations in p38^{MAPK} activation in the neocortex and hippocampus after kainic acid treatment. In contrast, a decrease in p38^{MAPK} activation was observed 10 days after the kainic acid treatment in other study (Mielke *et al.*, 1999) as well as in the pilocarpine model, where it occurred in association with a small increase in total p38^{MAPK} expression (Jung *et al.*, 2010). In our previous study, p38^{MAPK} was activated at 1 and 12 h after the induction of the pilocarpine status epilepticus in both neocortex and hippocampus, but returned to baseline levels in both structures in the chronic period (50 days). These findings may indicate that p38^{MAPK} activation is not associated to PTZ kindling maintenance as well as to the spontaneous seizure observed in the chronic period of pilocarpine model.

4.1 Conclusion

Our findings demonstrate that resistance to PTZ kindling is associated to unaltered ERK1/2, JNK1/2 and p38^{MAPK} phosphorylation

levels in the neocortex and hippocampus of mice. When the epileptogenesis induced by PTZ kindling manifests behaviorally, the MAPKs phosphorylation profile show a variable and non-linear pattern in the neocortex and hippocampus. These results point out the complexes crosslinks between the MAPKs in this experimental model of epileptogenesis. Further studies addressing specific signal transduction molecules and their pathways in the PTZ kindling model may help to identify potentials biomarkers for the treatment of epilepsies.

Acknowledgements

This study was supported by Grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq—Projects: IBN-Net #01.06.0842-00; INCT for Excitotoxicity and Neuroprotection), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX—Project NENASC), Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC). J.B., P.A.O., F.M.G., T.V.P. and F.C.M. received scholarships from CAPES, CNPq or FAPESC; R.B.L., R.W. and R.D.P. are supported by research fellowships from CNPq-Brazil. The authors have no financial or personal conflicts of interest related to this study.

References

- Beaumont TL, Yao B, Shah A, Kapatos G, Loeb J a (2012) Layer-specific CREB target gene induction in human neocortical epilepsy. *J Neurosci* 32:14389–14401 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3478758&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 4, 2013].
- Berg AT (2004) Understanding the delay before epilepsy surgery: who develops intractable focal epilepsy and when? *CNS Spectr* 9:136–144 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14999169> [Accessed January 21, 2014].
- Bevilaqua LRM, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2003) Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci* 17:897–902 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1460-9568.2003.02524.x> [Accessed September 26, 2013].
- Bonan CD, Amaral OB, Rockenbach IC, Walz R, Battastini AM, Izquierdo I, Sarkis JJ (2000) Altered ATP hydrolysis induced by pentylenetetrazol kindling in rat brain synaptosomes. *Neurochem Res* 25:775–779 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10943995> [Accessed January 24, 2014].
- Brecht S, Kirchhof R, Chromik A, Willesen M, Nicolaus T, Raivich G, Wessig J, Waetzig V, Goetz M, Claussen M, Pearse D, Kuan C-Y, Vaudano E, Behrens A, Wagner E, Flavell RA, Davis RJ, Herdegen T (2005) Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain. *Eur J Neurosci* 21:363–377 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15673436> [Accessed September 26, 2013].
- Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L (1991) Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 32:778–782 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1743148> [Accessed September 27, 2013].
- Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37–40 Available at:

- <http://dx.doi.org/10.1038/35065000> [Accessed September 27, 2013].
- Chen X, Wu J, Hua D, Shu K, Wang J-Z, Li L, Lei T (2010) The c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 is neuroprotective in amygdala kindled rats. *Brain Res* 1357:104–114 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20692238> [Accessed December 13, 2012].
- Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH (2001) MAP Kinases. *Chem Rev* 101:2449–2476 Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/cr000241p> [Accessed September 27, 2013].
- Choi Y-S, Cho H-Y, Hoyt KR, Naegele JR, Obrietan K (2008) IGF-1 receptor-mediated ERK/MAPK signaling couples status epilepticus to progenitor cell proliferation in the subgranular layer of the dentate gyrus. *Glia* 56:791–800 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18338791> [Accessed December 13, 2012].
- Cole-Edwards KK, Musto AE, Bazan NG (2006) c-Jun N-terminal kinase activation responses induced by hippocampal kindling are mediated by reactive astrocytes. *J Neurosci* 26:8295–8304 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899724> [Accessed February 5, 2013].
- Cordova FM, Rodrigues ALS, Giacomelli MBO, Oliveira CS, Posser T, Dunkley PR, Leal RB (2004) Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Res* 998:65–72 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000689930303040289> [Accessed January 21, 2014].
- Coulter DA (2001) Epilepsy-associated plasticity in gamma-aminobutyric acid receptor expression, function, and inhibitory synaptic properties. *Int Rev Neurobiol* 45:237–252 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11130901> [Accessed October 23, 2013].
- De Lemos L, Junyent F, Verdaguer E, Folch J, Romero R, Pallàs M, Ferrer I, Auladell C, Camins A (2010) Differences in activation of ERK1/2 and p38 kinase in Jnk3 null mice following KA treatment. *J Neurochem* 114:1315–1322 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20534003> [Accessed December 13, 2012].

- Dichter MA, Ayala GF (1987) Cellular mechanisms of epilepsy: a status report. *Science* 237:157–164 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3037700> [Accessed October 23, 2013].
- Dijke C-HH and P ten, Weston CR, Davis RJ (2007) The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 19:142–149 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067407000154> [Accessed September 26, 2013].
- Ekonomou a, Smith a L, Angelatou F (2001) Changes in AMPA receptor binding and subunit messenger RNA expression in hippocampus and cortex in the pentylentetrazole-induced “kindling” model of epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res* 95:27–35 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687274>.
- Galanopoulou AS, Buckmaster PS, Staley KJ, Moshé SL, Perucca E, Engel J, Löscher W, Noebels JL, Pitkänen A, Stables J, White HS, O’Brien TJ, Simonato M (2012) Identification of new epilepsy treatments: issues in preclinical methodology. *Epilepsia* 53:571–582 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3551973&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 21, 2014].
- Garrido YC, Sanabria ER, Funke MG, Cavaleiro E a, Naffah-Mazzacoratti MG (1998) Mitogen-activated protein kinase is increased in the limbic structures of the rat brain during the early stages of status epilepticus. *Brain Res Bull* 47:223–229 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9865854>.
- Hsieh C-L, Lin J-J, Chiang S-Y, Su S-Y, Tang N-Y, Lin G-G, Lin I-H, Liu C-H, Hsiang C-Y, Chen J-C, Ho T-Y (2007) Gastrodia elata modulated activator protein 1 via c-Jun N-terminal kinase signaling pathway in kainic acid-induced epilepsy in rats. *J Ethnopharmacol* 109:241–247 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16934418> [Accessed March 4, 2013].
- Huang R-Q, Bell-Horner CL, Dibas MI, Covey DF, Drewe JA, Dillon GH (2001) Pentylentetrazole-Induced Inhibition of Recombinant gamma -Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptors: Mechanism and Site of Action. *J Pharmacol Exp Ther* 298:986–995 Available at:

- <http://jpet.aspetjournals.org/content/298/3/986.long> [Accessed February 12, 2014].
- Jeon SH, Kim YS, Bae CD, Park JB (2000) Activation of JNK and p38 in rat hippocampus after kainic acid induced seizure. *Exp Mol Med* 32:227–230 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11190275>.
- Jung S, Bullis JB, Lau IH, Jones TD, Warner N, Poolos NP (2010) Downregulation of dendritic HCN channel gating in epilepsy is mediated by altered phosphorylation signaling. *J Neurosci* 30:6678–6688.
- Kang UG, Hong KS, Jung HY, Kim YS, Seong Y-S, Yang YC, Park J-B (2002) Activation and Tyrosine Phosphorylation of 44-kDa Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Induced by Electroconvulsive Shock in Rat Hippocampus. *J Neurochem* 63:1979–1982 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-4159.1994.63051979.x> [Accessed January 30, 2014].
- Kuan C-Y, Yang DD, Roy DRS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1999) The Jnk1 and Jnk2 Protein Kinases Are Required for Regional Specific Apoptosis during Early Brain Development. *Neuron* 22:667–676 Available at: [http://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273\(00\)80727-8](http://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273(00)80727-8) [Accessed September 26, 2013].
- Leal RB, Cordova FM, Herd L, Bobrovskaya L, Dunkley PR (2002) Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol* 178:44–51 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11781079> [Accessed January 21, 2014].
- Lee E, Son H (2009) Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep* 42:239–244 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19470236>.
- Lopes MW, Soares FMS, de Mello N, Nunes JC, de Cordova FM, Walz R, Leal RB (2012) Time-dependent modulation of mitogen activated protein kinases and AKT in rat hippocampus and cortex in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem Res* 37:1868–1878 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22614924> [Accessed December 13, 2012].
- Lüttjohann A, Fabene PF, van Luijtelaaar G (2009) A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav* 98:579–586

- Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19772866> [Accessed October 27, 2012].
- Meldrum BS, Akbar MT, Chapman AG (1999) Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res* 36:189–204 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515165> [Accessed October 23, 2013].
- Mielke K, Brecht S, Dorst a, Herdegen T (1999) Activity and expression of JNK1, p38 and ERK kinases, c-Jun N-terminal phosphorylation, and c-jun promoter binding in the adult rat brain following kainate-induced seizures. *Neuroscience* 91:471–483 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10366004>.
- Morgan L, Neame SJ, Child H, Chung R, Shah B, Barden L, Staddon JM, Patel TR (2006) Development of a pentylenetetrazole-induced seizure model to evaluate kinase inhibitor efficacy in the central nervous system. *Neurosci Lett* 395:143–148 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16300886> [Accessed February 6, 2013].
- Oliveira CS, Rigon AP, Leal RB, Rossi FM (2008) The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. *Int J Dev Neurosci* 26:355–362 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0736574807001827> [Accessed January 21, 2014].
- Park HJ, Kim HJ, Park HJ, Ra J, Zheng LT, Yim SV, Chung J-H (2008) Protective effect of topiramate on kainic acid-induced cell death in mice hippocampus. *Epilepsia* 49:163–167 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17868053> [Accessed March 4, 2013].
- Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346–356 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/603028> [Accessed January 21, 2014].
- Posser T, de Aguiar CBNM, Garcez RC, Rossi FM, Oliveira CS, Trentin AG, Neto VM, Leal RB (2007) Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. *Arch Toxicol* 81:407–414 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17333127> [Accessed January 21, 2014].

- Racine R, Okujava V, Chipashvili S (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. 3. Mechanisms. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32:295–299 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4110398> [Accessed September 4, 2013].
- Racine RJ (1972a) Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32:269–279 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4110396> [Accessed September 4, 2013].
- Racine RJ (1972b) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32:269–279 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4110397> [Accessed August 17, 2013].
- Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14:311–317 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959438804000649> [Accessed September 26, 2013].
- Thomas GM, Haganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:173–183 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1346> [Accessed November 7, 2012].
- Waetzig V, Herdegen T (2004) Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. *Neurosci Lett* 361:64–67 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394004002356> [Accessed September 27, 2013].
- Waetzig V, Zhao Y, Herdegen T (2006) The bright side of JNKs-Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration. *Prog Neurobiol* 80:84–97 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008206001079> [Accessed September 24, 2013].
- Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC, Roesler R, Izquierdo I, Cavalheiro EA, Martins VR, Brentani RR (1999) Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 40:1679–1682 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10612329> [Accessed January 24, 2014].

Zhang B, Wong M (2012) Pentylentetrazole-induced seizures cause acute, but not chronic, mTOR pathway activation in rat. *Epilepsia* 53:506–511 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22242835> [Accessed December 13, 2012].

FIGURES:

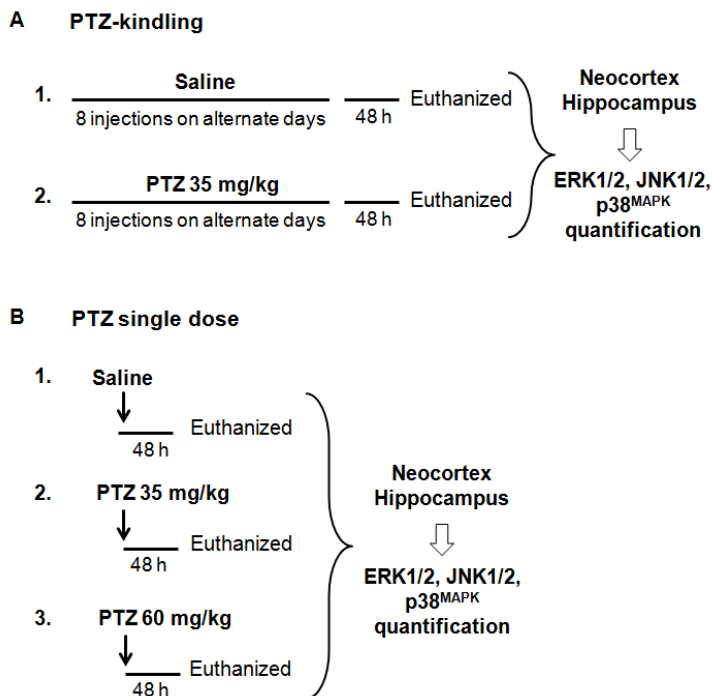


Figure 1: Experimental design. Panel A show the PTZ kindling model of epilepsy, in which animals received 8 subconvulsive PTZ injections (35 mg/kg, i.p.), and were observed for 30 min every stimulation day immediately after the PTZ administration; controls animals receive saline (10 ml/kg, i.p.) on alternate days (8 injections). Panel B show the PTZ single dose, in which animals received one single subconvulsive (35 mg/kg, i.p.) or convulsive (60 mg/kg, i.p.) PTZ doses; controls animals received one single dose of saline (10 ml/kg, i.p.). In both experiments neocortex and hippocampus were dissected for western blotting analysis.

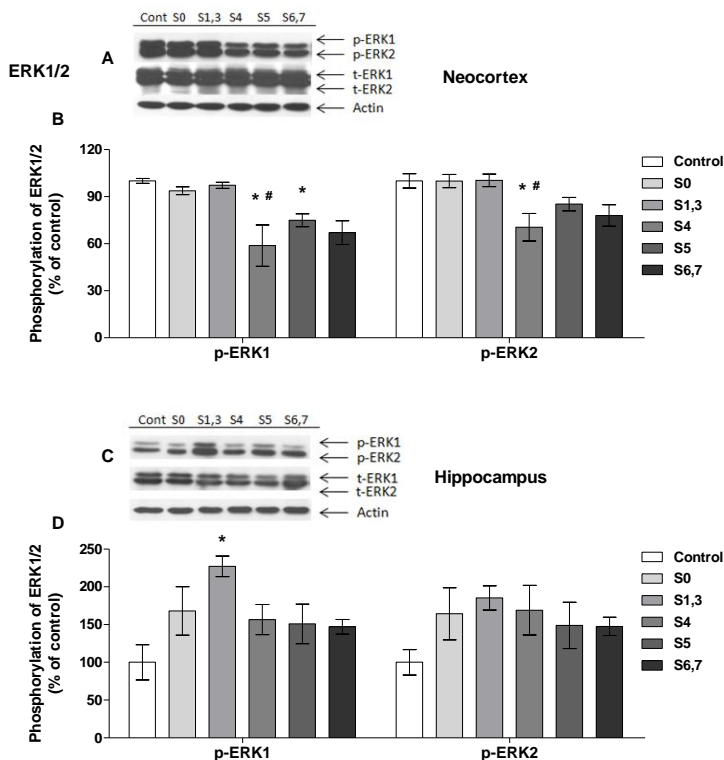


Figure 2: Western Blot analysis of ERK1/2 phosphorylation in the neocortex (A,B) and hippocampus (C,D) of rats submitted to the PTZ kindling model of epilepsy. The panel A and C shows a representative blot of neocortex immunoreactivity of the phospho-ERK1/2, total-ERK1/2 and anti- β actin (used as load control) in neocortex and hippocampus, respectively. The quantification of phospho-ERK1 and phospho-ERK2 are shown in the neocortex (B) and hippocampus (D). The phosphorylation level of each protein was determined by computer-assisted densitometry as a ratio of the O.D. of the phosphorylated band over the O.D. of the total band and the data are expressed as percentage of the control. The values are presented as mean \pm S.E.M. *Cont*, control group; *S0*, no days with convulsive seizures; *S1,3*, 1 to 3 days with convulsive seizures; *S4*, 4 days with convulsive seizures; *S5*, 5 days with convulsive seizures; *S6,7*, 6 and 7 days with convulsive seizures. * $p < 0.05$ compared to control group and # $p < 0.05$ compared to *S0* and *S1,3*.

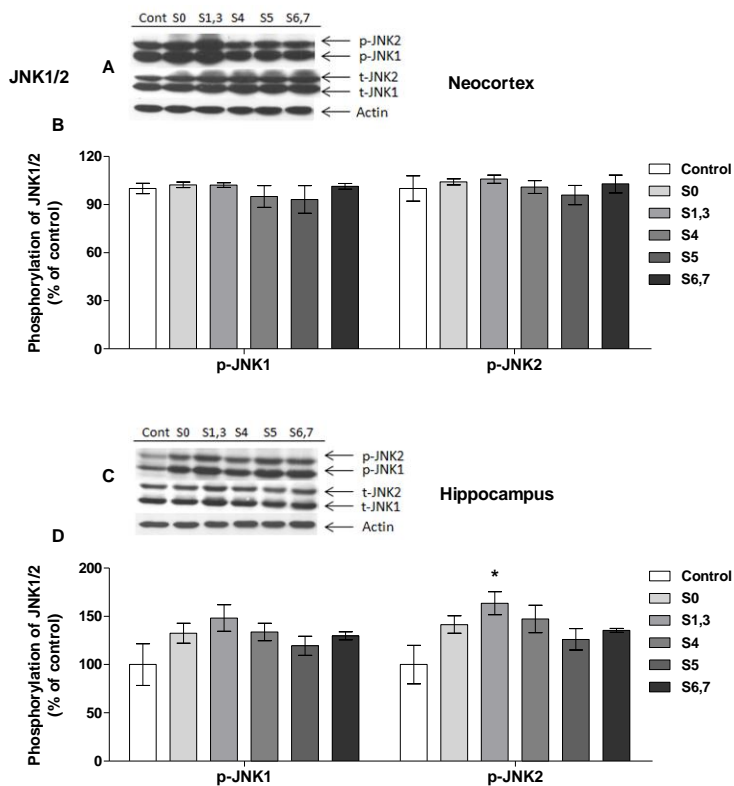


Figure 3: Western Blot analysis of JNK1/2 phosphorylation in the neocortex (A,B) and hippocampus (C,D) of rats submitted to the PTZ kindling model of epilepsy. The panel A and C shows a representative blot of neocortex immunoreactivity of the phospho-JNK1/2, total-JNK1/2 and anti- β actin (used as load control) in neocortex and hippocampus, respectively. The quantification of phospho-JNK1 and phospho-JNK2 are shown in the neocortex (B) and hippocampus (D). The phosphorylation level of each protein was determined by computer-assisted densitometry as a ratio of the O.D. of the phosphorylated band over the O.D. of the total band and the data are expressed as percentage of the control. The values are presented as mean \pm S.E.M. Cont, control group; S0, no days with convulsive seizures; S1,3, 1 to 3 days with convulsive seizures; S4, 4 days with convulsive seizures; S5, 5 days with convulsive seizures; S6,7, 6 and 7 days with convulsive seizures. * $p < 0.05$ compared to control group.

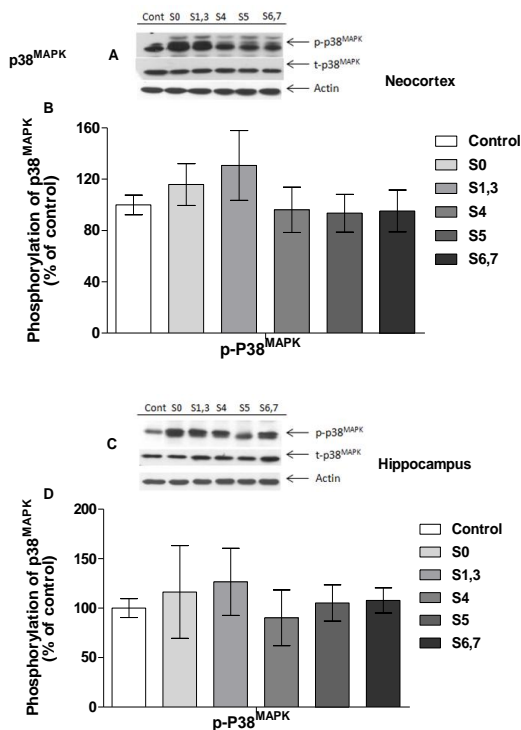


Figure 4: Western Blot analysis of p38^{MAPK} phosphorylation in the neocortex (A,B) and hippocampus (C,D) of rats submitted to the PTZ kindling model of epilepsy. The panel A and C shows a representative blot of neocortex immunoreactivity of the phospho-p38^{MAPK}, total-p38^{MAPK} and anti-β actin (used as load control) in neocortex and hippocampus, respectively. The quantification of phospho-p38^{MAPK} and phospho-p38^{MAPK} are shown in the neocortex (B) and hippocampus (D). The phosphorylation level of each protein was determined by computer-assisted densitometry as a ratio of the O.D. of the phosphorylated band over the O.D. of the total band and the data are expressed as percentage of the control. The values are presented as mean ± S.E.M. *Cont*, control group; *S0*, no days with convulsive seizures; *S1,3*, 1 to 3 days with convulsive seizures; *S4*, 4 days with convulsive seizures; *S5*, 5 days with convulsive seizures; *S6,7*, 6 and 7 days with convulsive seizures.

9. ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO

Brain MAPKs Levels are Differentially Associated with Seizures Threshold and Severity Progression in Pentylenetetrazole-Kindled Mice

Juliana Ben,¹ Filipe Marques Gonçalves,² Paulo Alexandre Oliveira,³ Tanara Vieira Peres,¹ Alexandre Hohl,^{4,5} Rodrigo Bainy Leal,^{1,2,5} Esper Abrão Cavalheiro,⁶ Rui Daniel Schroder Prediger^{1,3,5} & Roger Walz^{1,4,5}

¹ Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

² Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

³ Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

⁴ Departamento de Clínica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Hospital Universitário (HU), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

⁵ Centro de Neurociências Aplicadas (CeNAp), Hospital Universitário (HU), Florianópolis, Brazil

⁶ Disciplina de Neurologia Experimental, Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo (EPM/UNIFESP), São Paulo, Brazil

Correspondence

R. Walz, M.D., Ph.D., Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário, 3 andar, UFSC, Campus Universitário, Trindade Florianópolis, Brazil.

Tel.: +55-48-3721-9149;

Fax: +55-48-3721-9014;

E-mail: rogerwalz@hotmail.com

Received 2 May 2013; revision 28 May 2013;

accepted 29 May 2013

doi: 10.1111/cns.12147

Epilepsies are characterized by unprovoked recurrent epileptic seizures showing a prevalence of 5–10 cases per 1000 habitants in developed countries, which may be even higher in developing countries [1]. Despite their antiseizure effects, antiepileptic drugs (AEDs) had no clinically proved effects to prevent or reverse the epileptogenesis [2]. This indicates that AEDs mechanisms affecting seizure threshold may differ at least in part from those involved with epileptogenesis.

The kindling is a process of progressive and persistent intensification of seizure susceptibility during repeated chemical or electrical subthreshold stimulation, resulting in generalized seizures [3,4]. Although it is not proven that kindling process can occur in humans, kindling models have been extensively used for understanding the basic mechanisms of epileptogenesis as well pharmacological screening for new AEDs. The mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are a group of serine–threonine kinases that amplify and integrate signals originating from a variety of extracellular stimuli. They regulate several processes in the CNS including cell differentiation, survival, cell death, and synaptic plasticity. They consist of three main kinases subfamilies, the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2), the c-Jun-N-terminal kinases 1–3 (JNK1/2/3), and the p38 kinases α – δ (p38^{MAPK} α /b/c/d) [5–8]. Changes of these cellular cascades systems have been associated with the time course-related epileptogenesis process in rodents [6,9,10].

The pentylenetetrazol, a blocker of the chloride ionophore channel of the GABA_A receptor, is worldwide used in chemical kindling protocols in rodents [3,4]. Here, we investigated whether the total and phosphorylated levels of ERK1, ERK2, JNK1, JNK2, p38 in the cortex and hippocampus of PTZ-kindled mice were differentially associated with (1) kindling progression estimated by the number of days with convulsive seizures and (2) seizure latency determined by the time course (in seconds) between the PTZ injection and the convulsive seizure start in the last stimulation day.

All procedures were carried out between 9–12 a.m. and according to UFSC Ethics Committee. Adult male Swiss mice ($n = 24$) received a subconvulsive dose of PTZ (35 mg/kg, i.p.) on alternate days, and the increasing of epileptic seizures intensity (Racine stage 1–5) with each administration was monitored behaviorally during 1 h as previously described [3,4]. Control animals ($n = 4$) received eight saline injections also on alternate days. After the 8 days of PTZ stimulation, two animals died, three had only one convulsive seizure and four were resistant to kindling. The remained 15 kindled animals and controls were euthanized by decapitation 48 h after the last injection and their cortex and hippocampus were removed for the neurochemical analysis. This time course between the last injection and the biologic samples collection was based on our previous observation (data not shown) that MAPKs parameters already return to basal levels after

Table 1 Variables associated with the number of days with seizure in PTZ-kindled mice

Predictive variables	R	R ²	B coefficient	*P* level
Latency for the last seizure onset	0.45	0.20	-0.004	0.09
Latency for the first seizure onset	0.09	0.009	0.000	0.74
MAPKs levels in the cortex				
Total ERK1	0.05	0.003	-0.02	0.85
Phospho-ERK1	0.32	0.10	-0.02	0.24
Total ERK2	0.45	0.20	-0.18	0.09
Phospho-ERK2	0.28	0.08	-0.02	0.31
Total JNK1	0.21	0.04	-0.08	0.45
Phospho-JNK1	0.03	0.001	0.004	0.91
Total JNK2	0.52	0.07	-0.15	0.05
Phospho-JNK2	0.08	0.007	-0.01	0.76
Total p38	0.10	0.01	0.007	0.71
Phospho-p38	0.33	0.11	-0.01	0.22
MAPKs levels in the hippocampus				
Total ERK1	0.06	0.004	0.007	0.82
Phospho-ERK1	0.56	0.31	-0.01	0.03
Total ERK2	0.13	0.02	0.009	0.63
Phospho-ERK2	0.32	0.10	-0.008	0.24
Total JNK1	0.35	0.12	0.03	0.20
Phospho-JNK1	0.36	0.13	-0.02	0.19
Total JNK2	0.35	0.12	0.02	0.20
Phospho-JNK2	0.49	0.25	-0.04	0.06
Total p38	0.50	0.25	-0.02	0.06
Phospho-p38	0.23	0.05	-0.006	0.41

a single PTZ-convulsion, excluding any residual effects of PTZ or the epileptic seizure on the neurochemical parameters.

The total and phosphorylated MAPKs were determined by Western blotting as previously described [6]. The whole cellular content of neocortex and hippocampus homogenized in 400 μ l of Tris 50 mMpH7.0, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0.1 mM, Na₃VO₄

Table 2 Variables associated with the latency for the seizure onset of the last convulsive seizure in PTZ-kindled mice

Predictive variables	R	R ²	B coefficient	*P* level
Number of days with seizure	0.45	0.20	-22.3	0.01
Latency for the first seizure onset	0.63	0.39	0.46	0.01
MAPKs levels in the cortex				
Total ERK1	0.40	0.16	-14.6	0.14
Phospho-ERK1	0.26	0.07	1.77	0.35
Total ERK2	0.41	0.17	18.9	0.13
Phospho-ERK2	0.10	0.01	0.93	0.71
Total JNK1	0.08	0.006	-3.27	0.78
Phospho-JNK1	0.05	0.003	0.63	0.86
Total JNK2	0.21	0.04	6.79	0.46
Phospho-JNK2	0.09	0.008	1.31	0.75
Total p38	0.62	0.40	-4.52	0.01
Phospho-p38	0.71	0.50	2.47	0.003
MAPKs levels in the hippocampus				
Total ERK1	0.36	0.13	-4.15	0.19
Phospho-ERK1	0.23	0.05	0.69	0.41
Total ERK2	0.17	0.03	1.35	0.54
Phospho-ERK2	0.06	0.004	-0.17	0.83
Total JNK1	0.12	0.01	1.06	0.66
Phospho-JNK1	0.02	0.000	0.12	0.95
Total JNK2	0.14	0.02	-1.38	0.61
Phospho-JNK2	0.35	0.12	1.95	0.20
Total p38	0.18	0.03	1.20	0.51
Phospho-p38	0.18	0.03	0.56	0.52

2 mM, Triton X-100 1%, glycerol 10%, Sigma protease inhibitor cocktail and then incubated for 10 min in ice. Lysates were centrifuged (10,000 g for 10 min, at 4°C) to eliminate cellular debris. All membranes were incubated with mouse anti- β -actin antibody to control the proteins amounts loaded on the gel. The MAPKs quantifications by the Scion Image software were expressed as optic density (OD) percentage of controls. The phosphorylation

Table 3 Predictive model showing the variables independently associated with number of days with seizure in PTZ-kindled mice

Predictive variables	B coefficient (CI 95%)	*P* level
Constant	-6.27 (-15.58 to -3.04)	0.16
MAPKs levels in the hippocampus		
Phospho-ERK1	-0.02 (-0.04 to -0.005)	0.003
Phospho-JNK2	-0.08 (-0.12 to -0.03)	0.002
Total JNK1	0.08 (0.02 to 0.13)	0.009
Phospho-JNK1	0.13 (0.06 to 0.21)	0.001

Model summary: $R = 0.87$, $R^2 = 0.75$, $F = 7.58$, $P = 0.004$

Representative figures of MAPKs immunoblottings

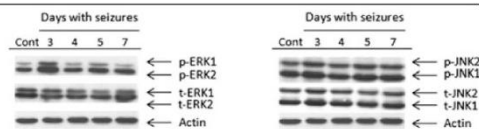
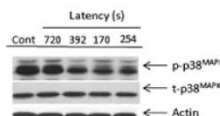


Table 4 Variables independently associated with the latency for seizure onset of the last convulsive seizure in PTZ-kindled mice

Predictive variables	B coefficient (CI 95%)	"P" level
Constant	-34.9 (-192.4 to 122.4)	0.64
Latency for the first seizure onset	0.30 (0.001 to 0.61)	0.04
MAPK levels in the Cortex		
Phospho-p38	1.90 (0.44 to 3.35)	0.01

Model summary: $R = 0.80$, $R^2 = 0.64$, $F = 10.4$, $P = 0.002$

Representative figures of MAPKs immunoblottings



levels of MAPKs were determined as a ratio of OD of phosphorylated band/OD of total band [6].

All data analyzed showed a normal distribution (one-sample Kolmogorov-Smirnov test, $P > 0.25$). The univariate analysis was done by linear regressions to identify the neurochemical variables associated with kindling progression and the latency for the last seizure onset at a " P " level ≤ 0.20 (see bold values in the Tables 1 and 2). Thereafter, these variables were included in the multiple linear regressions analysis to identify the MAPKs independently associated with kindling progression and latency for the last seizure occurrence. Because of the biologic plausibility, we also included in the multivariate analysis the variable latency for the seizure onset in the first day with convulsive seizure (Racine 4 or 5). To minimize spurious association due to the multiple comparisons, only " P " levels lower than 0.01 were considered statistically significant in the final model of logistic regression. Analyses were done by SPSS 17.0 (Chicago, IL, USA).

The final multiple linear regression model including the total JNK2 in the cortex and phospho-ERK1, phospho-JNK2, total JNK1 and phospho-JNK1 in the hippocampus showed a very strong association ($R = 0.88$) with the kindling progression estimated by the number of days with Racine stage 4 or 5 in kindled mice (Table 3). These variables explained 66% (adjusted $R^2 = 0.66$) of the variance in the number of days with seizure ($F = 6.92$, $P = 0.005$).

The final multiple linear regression model including the cortex phospho-p38 level and the latency for the seizure occurrence after PTZ injection in the first day with Racine stage 5 seizure showed a very strong association ($R = 0.80$) to the latency for seizure onset after the last PTZ injection (Table 4). These variables together explained 65% (adjusted $R^2 = 0.65$) of the variance of latency for

seizure onset (Racine stage 5) in the last stimulation day of PTZ-kindled mice ($F = 11.9$, $P = 0.001$).

The experimental design applied here does not confirm a cause-effect relationship among the brain MAPKs levels and kindling development. However, our findings may indicate that brain MAPKs levels variations are predictors' biomarkers of the PTZ-kindling development parameters in mice. The independent predictive power of these biomarkers is variable according to the analyzed parameters (number of days with seizures or latency for the last seizure onset) raising the possibility that mechanisms involved with epileptogenesis and seizure threshold may differ in the PTZ-kindling. The mechanisms may involve differential changes in the total or activated MAPKs content according to the cortical and subcortical brain region. These findings may be, at least in part, related to the lack of clinically relevant effects of antiseizure drugs against an installed epileptogenesis.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), IBN/Net/CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Projeto CAPES/PROCAD, Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC-PRONEX, NENASC Project) and Instituto Nacional de C&T de Neurociência Translacional.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bartolini E, Bell CS, Sander JW. Multicultural challenges in epilepsy. *Epilepsy Behav* 2011;20:428-434.
- Galanopoulou AS, Buckmaster PS, Staley KJ, et al. Identification of new epilepsy treatments: issues in preclinical methodology. *Epilepsia* 2012;53:571-582.
- Bonam CD, Amaral OB, Rockenbach JC, et al. Altered ATP hydrolysis induced by pentylenetetrazol kindling in rat brain synaptosomes. *Neurochem Res* 2000;25:775-779.
- Wala R, Amaral OB, Rockenbach JC, et al. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 1999;40:1679-1682.
- Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002;298:1911-1912.
- Lopes MW, Soares FM, de Mello N, et al. Time-dependent modulation of mitogen activated protein kinases and AKT in rat hippocampus and cortex in the

- pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem Res* 2012;**37**:1868–1878.
7. Martin KG, Michael D, Rose JC, et al. MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron* 1997;**18**:899–912.
8. Wale R, Lenz G, Roeder R, et al. Time-dependent enhancement of inhibitory avoidance retention and MAPK activation by post-training infusion of nerve growth factor into CA1 region of hippocampus of adult rats. *Eur J Neurosci* 2000;**12**:2185–2189.
9. Garrido YC, Sanabolia ER, Funke MG, Cavalheiro EA, Naffab-Mazzacorati MG. Mitogen-activated protein kinase is increased in the limbic structures of the rat brain during the early stages of status epilepticus. *Brain Res Bull* 1998;**47**:223–229.
10. Waltz R, Castro RM, Velasco TR, et al. Cellular prion protein: implications in seizures and epilepsy. *Cell Mol Neurobiol* 2002;**22**:249–257.

10. REFERÊNCIAS

- Alfieri, P., Piccini, G., Caciolo, C., Perrino, F., Gambardella, M.L., Mallardi, M., Cesarini, L., Leoni, C., Leone, D., Fossati, C., Selicorni, A., Digilio, M.C., Tartaglia, M., Mercuri, E., Zampino, G., & Vicari, S. (2014) Behavioral Profile in RASopathies. *Am. J. Med. Genet. A.*
- Annegers, J.F., Hauser, W.A., Beghi, E., Nicolosi, A., & Kurland, L.T. (1988) The risk of unprovoked seizures after encephalitis and meningitis. *Neurology*, **38**, 1407–1410.
- Avanzini, G., Moshé, S.L., Schwartzkroin, P.A., Engel, J. Jr. (1997) Animals models of localization-related epilepsy. In Engel, Jerome Jr; Pedley, T.A. (ed), *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 427 - 442.
- Beaumont, T.L., Yao, B., Shah, A., Kapatos, G., & Loeb, J. a (2012) Layer-specific CREB target gene induction in human neocortical epilepsy. *J. Neurosci.*, **32**, 14389–14401.
- Berg, A.T. (2004) Understanding the delay before epilepsy surgery: who develops intractable focal epilepsy and when? *CNS Spectr.*, **9**, 136–144.
- Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T. a, Mathern, G.W., Moshé, S.L., Nordli, D., Plouin, P., & Scheffer, I.E. (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, **51**, 676–685.
- Bevilaqua, L.R.M., Kerr, D.S., Medina, J.H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2003) Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur. J. Neurosci.*, **17**, 897–902.

- Bhat, R. V, Shanley, J., Correll, M.P., Fieles, W.E., Keith, R.A., Scott, C.W., & Lee, C.M. (2000) Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 11074–11079.
- Bonan, C.D., Amaral, O.B., Rockenbach, I.C., Walz, R., Battastini, A.M., Izquierdo, I., & Sarkis, J.J. (2000) Altered ATP hydrolysis induced by pentylentetrazol kindling in rat brain synaptosomes. *Neurochem. Res.*, **25**, 775–779.
- Brazil, D.P., Yang, Z.-Z., & Hemmings, B.A. (2004) Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem. Sci.*, **29**, 233–242.
- Brecht, S., Kirchhof, R., Chromik, A., Willesen, M., Nicolaus, T., Raivich, G., Wessig, J., Waetzig, V., Goetz, M., Claussen, M., Pearce, D., Kuan, C.-Y., Vaudano, E., Behrens, A., Wagner, E., Flavell, R.A., Davis, R.J., & Herdegen, T. (2005) Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain. *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 363–377.
- Cavalheiro, E.A., Leite, J.P., Bortolotto, Z.A., Turski, W.A., Ikonomidou, C., & Turski, L. (1991) Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*, **32**, 778–782.
- Cavalheiro, E.A., Santos, N.F., & Priel, M.R. (1996) The pilocarpine model of epilepsy in mice. *Epilepsia*, **37**, 1015–1019.
- Chang, L. & Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**, 37–40.
- Chen, X., Wu, J., Hua, D., Shu, K., Wang, J.-Z., Li, L., & Lei, T. (2010) The c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 is neuroprotective in amygdala kindled rats. *Brain Res.*, **1357**, 104–114.

- Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., & Cobb, M.H. (2001) MAP Kinases. *Chem. Rev.*, **101**, 2449–2476.
- Choi, Y.-S., Cho, H.-Y., Hoyt, K.R., Naegele, J.R., & Obrietan, K. (2008) IGF-1 receptor-mediated ERK/MAPK signaling couples status epilepticus to progenitor cell proliferation in the subgranular layer of the dentate gyrus. *Glia*, **56**, 791–800.
- Chong, Z.Z., Li, F., & Maiese, K. (2005) Activating Akt and the brain's resources to drive cellular survival and prevent inflammatory injury. *Histol. Histopathol.*, **20**, 299–315.
- Cohen, S. & Greenberg, M.E. (2008) Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **24**, 183–209.
- Cole-Edwards, K.K., Musto, A.E., & Bazan, N.G. (2006) c-Jun N-terminal kinase activation responses induced by hippocampal kindling are mediated by reactive astrocytes. *J. Neurosci.*, **26**, 8295–8304.
- Connors, B.W. & Gutnick, M.J. (1990) Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci.*, **13**, 99–104.
- Cordova, F.M., Rodrigues, A.L.S., Giacomelli, M.B.O., Oliveira, C.S., Posser, T., Dunkley, P.R., & Leal, R.B. (2004) Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Res.*, **998**, 65–72.
- Coulter, D.A. (2001) Epilepsy-associated plasticity in gamma-aminobutyric acid receptor expression, function, and inhibitory synaptic properties. *Int. Rev. Neurobiol.*, **45**, 237–252.
- Cowan, K.J. (2003) Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J. Exp. Biol.*, **206**, 1107–1115.

- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., & Hemmings, B.A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, **378**, 785–789.
- Datta, S.R., Brunet, A., & Greenberg, M.E. (1999) Cellular survival : a play in three Akts **13**, 2905–2927.
- De Lemos, L., Junyent, F., Verdaguer, E., Folch, J., Romero, R., Pallàs, M., Ferrer, I., Auladell, C., & Camins, A. (2010) Differences in activation of ERK1/2 and p38 kinase in Jnk3 null mice following KA treatment. *J. Neurochem.*, **114**, 1315–1322.
- Dichter, M.A. & Ayala, G.F. (1987) Cellular mechanisms of epilepsy: a status report. *Science*, **237**, 157–164.
- Dijke, C.-H.H. and P. ten, Weston, C.R., & Davis, R.J. (2007) The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **19**, 142–149.
- Dudek, H. (1997) Regulation of Neuronal Survival by the Serine-Threonine Protein Kinase Akt. *Science* (80-), **275**, 661–665.
- Dunleavy, M., Provenzano, G., Henshall, D.C., & Bozzi, Y. (2013) Kainic acid-induced seizures modulate Akt (SER473) phosphorylation in the hippocampus of dopamine D2 receptor knockout mice. *J. Mol. Neurosci.*, **49**, 202–210.
- Ekonomou, a, Smith, a L., & Angelatou, F. (2001) Changes in AMPA receptor binding and subunit messenger RNA expression in hippocampus and cortex in the pentylene-tetrazole-induced “kindling” model of epilepsy. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **95**, 27–35.
- Eldar-Finkelman, H. (2002) Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol. Med.*, **8**, 126–132.
- Engel, J. (1996) Surgery for seizures. *N. Engl. J. Med.*, **334**, 647–652.
- Engel, J., Pitkänen, A., Loeb, J. a, Dudek, F.E., Bertram, E.H., Cole, A.J., Moshé, S.L., Wiebe, S., Jensen, F.E., Mody, I., Nehlig, A., &

- Vezzani, A. (2013) Epilepsy biomarkers. *Epilepsia*, **54 Suppl 4**, 61–69.
- Engel, J.J. (1989) Mechanisms of neuronal excitation and synchronization. In Engel, J.J. (ed), *Seizures and Epilepsy*. FA Davis, Philadelphia, pp. 41 – 70.
- Ferro, J.M., Correia, M., Rosas, M.J., Pinto, A.N., & Neves, G. (2003) Seizures in cerebral vein and dural sinus thrombosis. *Cerebrovasc. Dis.*, **15**, 78–83.
- Frame, S. & Cohen, P. (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.*, **359**, 1–16.
- Galanopoulou, A.S., Buckmaster, P.S., Staley, K.J., Moshé, S.L., Perucca, E., Engel, J., Löscher, W., Noebels, J.L., Pitkänen, A., Stables, J., White, H.S., O'Brien, T.J., & Simonato, M. (2012) Identification of new epilepsy treatments: issues in preclinical methodology. *Epilepsia*, **53**, 571–582.
- Garrido, Y.C., Sanabria, E.R., Funke, M.G., Cavalheiro, E. a, & Naffah-Mazzacoratti, M.G. (1998) Mitogen-activated protein kinase is increased in the limbic structures of the rat brain during the early stages of status epilepticus. *Brain Res. Bull.*, **47**, 223–229.
- Glauser, T., Ben-Menachem, E., Bourgeois, B., Cnaan, A., Chadwick, D., Guerreiro, C., Kalviainen, R., Mattson, R., Perucca, E., & Tomson, T. (2006) ILAE treatment guidelines: evidence-based analysis of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. *Epilepsia*, **47**, 1094–1120.
- Glauser, T., Ben-Menachem, E., Bourgeois, B., Cnaan, A., Guerreiro, C., Kälviäinen, R., Mattson, R., French, J.A., Perucca, E., & Tomson, T. (2013) Updated ILAE evidence review of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. *Epilepsia*, **54**, 551–563.

- Greengard, P. (2001) The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science*, **294**, 1024–1030.
- Hanada, M., Feng, J., & Hemmings, B.A. (2004) Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, **1697**, 3–16.
- Hauser, W. (1997) Incidence and Prevalence. In Engel, Jerome Jr; Pedley, T.A. (ed), *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 47 – 57.
- Hemmings, B. a & Restuccia, D.F. (2012) PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, a011189.
- Hsieh, C.-L., Lin, J.-J., Chiang, S.-Y., Su, S.-Y., Tang, N.-Y., Lin, G.-G., Lin, I.-H., Liu, C.-H., Hsiang, C.-Y., Chen, J.-C., & Ho, T.-Y. (2007) *Gastrodia elata* modulated activator protein 1 via c-Jun N-terminal kinase signaling pathway in kainic acid-induced epilepsy in rats. *J. Ethnopharmacol.*, **109**, 241–247.
- Huang, R.-Q., Bell-Horner, C.L., Dibas, M.I., Covey, D.F., Drewe, J.A., & Dillon, G.H. (2001) Pentylentetrazole-Induced Inhibition of Recombinant gamma -Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptors: Mechanism and Site of Action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **298**, 986–995.
- Huang, W.-J., Tian, F.-F., Chen, J.-M., Guo, T.-H., Ma, Y.-F.Y., Fang, J., Dang, J., & Song, M.-Y. (2013) GSK-3 β may be involved in hippocampal mossy fiber sprouting in the pentylentetrazole-kindling model. *Mol. Med. Rep.*, **8**, 1337–1342.
- Janz, D. (1985) Epilepsy: seizures and syndromes. Antiepileptic drugs. In Frey, HH; Janz, D. (ed), *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Berlin, pp. 3 – 34.
- Jeon, S.H., Kim, Y.S., Bae, C.D., & Park, J.B. (2000) Activation of JNK and p38 in rat hippocampus after kainic acid induced seizure. *Exp. Mol. Med.*, **32**, 227–230.

- Jope, R.S. & Johnson, G.V.W. (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.*, **29**, 95–102.
- Jung, S., Bullis, J.B., Lau, I.H., Jones, T.D., Warner, N., & Poolos, N.P. (2010) Downregulation of dendritic HCN channel gating in epilepsy is mediated by altered phosphorylation signaling. *J. Neurosci.*, **30**, 6678–6688.
- Kale, R. (1997) Bringing epilepsy out of the shadows. *BMJ*, **315**, 2–3.
- Kandel, E.R. (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, **294**, 1030–1038.
- Kang, U.G., Hong, K.S., Jung, H.Y., Kim, Y.S., Seong, Y.-S., Yang, Y.C., & Park, J.-B. (2002) Activation and Tyrosine Phosphorylation of 44-kDa Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Induced by Electroconvulsive Shock in Rat Hippocampus. *J. Neurochem.*, **63**, 1979–1982.
- Kuan, C.-Y., Yang, D.D., Roy, D.R.S., Davis, R.J., Rakic, P., & Flavell, R.A. (1999) The Jnk1 and Jnk2 Protein Kinases Are Required for Regional Specific Apoptosis during Early Brain Development. *Neuron*, **22**, 667–676.
- Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A.T., Brodie, M.J., Allen Hauser, W., Mathern, G., Moshé, S.L., Puccia, E., Wiebe, S., & French, J. (2010) Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, **51**, 1069–1077.
- Leal, R.B., Cordova, F.M., Herd, L., Bobrovskaya, L., & Dunkley, P.R. (2002) Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **178**, 44–51.
- Lee, C.-Y., Jaw, T., Tseng, H.-C., Chen, I.-C., & Liou, H.-H. (2012) Lovastatin modulates glycogen synthase kinase-3 β pathway and inhibits mossy fiber sprouting after pilocarpine-induced status epilepticus. *PLoS One*, **7**, e38789.

- Lee, E. & Son, H. (2009) Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep.*, **42**, 239–244.
- Lei, P., Ayton, S., Bush, A.I., & Adlard, P.A. (2011) GSK-3 in Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Alzheimers. Dis.*, **2011**, 189246.
- Leroy, K. & Brion, J.-P. (1999) Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3 β in rat brain. *J. Chem. Neuroanat.*, **16**, 279–293.
- Lesuisse, C. & Martin, L.J. (2002) Immature and mature cortical neurons engage different apoptotic mechanisms involving caspase-3 and the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **22**, 935–950.
- Llinas, R. (1988) The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science (80-.)*, **242**, 1654–1664.
- Lopes, M.W., Soares, F.M.S., de Mello, N., Nunes, J.C., de Cordova, F.M., Walz, R., & Leal, R.B. (2012) Time-dependent modulation of mitogen activated protein kinases and AKT in rat hippocampus and cortex in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem. Res.*, **37**, 1868–1878.
- Löscher, W., Klitgaard, H., Twyman, R.E., & Schmidt, D. (2013) New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **12**, 757–776.
- Lossius, M.I., Rønning, O.M., Slapø, G.D., Mowinckel, P., & Gjerstad, L. (2005) Poststroke epilepsy: occurrence and predictors--a long-term prospective controlled study (Akershus Stroke Study). *Epilepsia*, **46**, 1246–1251.
- Lothman, E. (1997) Biological consequences of repeated seizures. In Engel, J.J. (ed), *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 481 – 498.

- Luo, Y. & DeFranco, D.B. (2006) Opposing roles for ERK1/2 in neuronal oxidative toxicity: distinct mechanisms of ERK1/2 action at early versus late phases of oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, **281**, 16436–16442.
- Lüttjohann, A., Fabene, P.F., & van Luijtelaar, G. (2009) A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol. Behav.*, **98**, 579–586.
- Macdonald, R.L. (1997) Cellular Effects of Antiepileptic Drugs. In Engel, Jerome Jr; Pedley, T.A. (ed), *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 1383 – 1391.
- Mathern, G.W., Cifuentes, F., Leite, J.P., Pretorius, J.K., & Babb, T.L. (1993) Hippocampal EEG excitability and chronic spontaneous seizures are associated with aberrant synaptic reorganization in the rat intrahippocampal kainate model. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **87**, 326–339.
- McNamara, J.O. & Wada, J.A. (1997) Kindling model. In Engel, Jerome Jr; Pedley, T.A. (ed), *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 419 - 426.
- Meldrum, B.S., Akbar, M.T., & Chapman, A.G. (1999) Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res.*, **36**, 189–204.
- Mielke, K., Brecht, S., Dorst, a, & Herdegen, T. (1999) Activity and expression of JNK1, p38 and ERK kinases, c-Jun N-terminal phosphorylation, and c-jun promoter binding in the adult rat brain following kainate-induced seizures. *Neuroscience*, **91**, 471–483.
- Mielke, K. & Herdegen, T. (2000) JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog. Neurobiol.*, **61**, 45–60.
- Mines, M.A., Beurel, E., & Jope, R.S. (2011) Regulation of cell survival mechanisms in Alzheimer's disease by glycogen synthase kinase-3. *Int. J. Alzheimers. Dis.*, **2011**, 861072.

- Mody, I. & Schwartzkroin, P.A. (1997) Acute seizure models (intact animals). In Engel, Jerome Jr; Pedley, T.A. (ed), *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 397 - 404.
- Morgan, L., Neame, S.J., Child, H., Chung, R., Shah, B., Barden, L., Staddon, J.M., & Patel, T.R. (2006) Development of a pentylenetetrazole-induced seizure model to evaluate kinase inhibitor efficacy in the central nervous system. *Neurosci. Lett.*, **395**, 143–148.
- Mulley, J.C., Scheffer, I.E., Harkin, L.A., Berkovic, S.F., & Dibbens, L.M. (2005) Susceptibility genes for complex epilepsy. *Hum. Mol. Genet.*, **14 Spec No**, R243–9.
- Nestler, E.J. & Greengard, P. (1984) Neuron-specific phosphoproteins in mammalian brain. *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.*, **17**, 483–488.
- Noebels, J.L., Fariello, R.G.; Jobe, P.C.; Lasley, S.; Marescaus, C. (1997) Genetic models of generalized epilepsy. In Engel, Jerome Jr; Pedley, T.A. (ed), *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 457 - 466.
- Oliveira, C.S., Rigon, A.P., Leal, R.B., & Rossi, F.M. (2008) The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **26**, 355–362.
- Park, H.J., Kim, H.J., Park, H.J., Ra, J., Zheng, L.T., Yim, S.V., & Chung, J.-H. (2008) Protective effect of topiramate on kainic acid-induced cell death in mice hippocampus. *Epilepsia*, **49**, 163–167.
- Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S., & Haydon, P.G. (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*, **369**, 744–747.
- Pauli, C., Thais, M.E. de O., Claudino, L.S., Bicalho, M.A.H., Bastos, A.C., Guarnieri, R., Nunes, J.C., Lin, K., Linhares, M.N., & Walz,

- R. (2012) Predictors of quality of life in patients with refractory mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.*, **25**, 208–213.
- Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, **83**, 346–356.
- Porter, J.T. & McCarthy, K.D. (1996) Hippocampal Astrocytes In Situ Respond to Glutamate Released from Synaptic Terminals. *J. Neurosci.*, **16**, 5073–5081.
- Posser, T., de Aguiar, C.B.N.M., Garcez, R.C., Rossi, F.M., Oliveira, C.S., Trentin, A.G., Neto, V.M., & Leal, R.B. (2007) Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. *Arch. Toxicol.*, **81**, 407–414.
- Racine, R., Okujava, V., & Chipashvili, S. (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. 3. Mechanisms. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **32**, 295–299.
- Racine, R.J. (1972a) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **32**, 269–279.
- Racine, R.J. (1972b) Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **32**, 269–279.
- Risch, N. & Merikangas, K. (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, **273**, 1516–1517.
- Rodgers, E.E. & Theibert, A.B. (2002) Functions of PI 3-kinase in development of the nervous system. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **20**, 187–197.
- Salazar, A.M., Jabbari, B., Vance, S.C., Grafman, J., Amin, D., & Dillon, J.D. (1985) Epilepsy after penetrating head injury. I.

- Clinical correlates: a report of the Vietnam Head Injury Study. *Neurology*, **35**, 1406–1414.
- Scharfman, H.E. (2007) The neurobiology of epilepsy. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, **7**, 348–354.
- Scheid, M.P. & Woodgett, J.R. (2003) Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett.*, **546**, 108–112.
- Schenk, U., Menna, E., Kim, T., Passafaro, M., Chang, S., De Camilli, P., & Matteoli, M. (2005) A novel pathway for presynaptic mitogen-activated kinase activation via AMPA receptors. *J. Neurosci.*, **25**, 1654–1663.
- Snead, O.C. (1995) Basic mechanisms of generalized absence seizures. *Ann. Neurol.*, **37**, 146–157.
- Stanciu, M. (2000) Persistent Activation of ERK Contributes to Glutamate-induced Oxidative Toxicity in a Neuronal Cell Line and Primary Cortical Neuron Cultures. *J. Biol. Chem.*, **275**, 12200–12206.
- Sweatt, J.D. (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J. Neurochem.*, **76**, 1–10.
- Sweatt, J.D. (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **14**, 311–317.
- Thomas, G.M. & Huganir, R.L. (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 173–183.
- Todd, J.A. (1999) Interpretation of results from genetic studies of multifactorial diseases. *Lancet*, **354 Suppl**, SI15–6.
- Tripathi, P.P., Santorufo, G., Brilli, E., Borrelli, E., & Bozzi, Y. (2010) Kainic acid-induced seizures activate GSK-3 β in the hippocampus of D2R $^{-/-}$ mice. *Neuroreport*, **21**, 846–850.

- Waetzig, V. & Herdegen, T. (2004) Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. *Neurosci. Lett.*,.
- Waetzig, V., Zhao, Y., & Herdegen, T. (2006) The bright side of JNKs- Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration. *Prog. Neurobiol.*, **80**, 84–97.
- Walker, M.C.M., White, H., & Sander, J. (2002) Disease modification in partial epilepsy. *Brain*, **125**, 1937–1950.
- Walz, R., Amaral, O.B., Rockenbach, I.C., Roesler, R., Izquierdo, I., Cavalheiro, E.A., Martins, V.R., & Brentani, R.R. (1999) Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia*, **40**, 1679–1682.
- Walz, R., Castro, R.M.R.P.S., Velasco, T.R., Carlotti, C.G., Sakamoto, A.C., Brentani, R.R., & Martins, V.R. (2002) Cellular prion protein: implications in seizures and epilepsy. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **22**, 249–257.
- Walz, R., Lin, K., Linhares, M.N. (2011) Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos. In Kapczinski, F., Quevedo, J., Izquierdo, I. (ed), *As Epilepsias*. Artmed, Porto Alegre, 311-328.
- Wilby, J., Kainth, A., Hawkins, N., Epstein, D., McIntosh, H., McDaid, C., Mason, A., Golder, S., O'Meara, S., Sculpher, M., Drummond, M., & Forbes, C. (2005) Clinical effectiveness, tolerability and cost-effectiveness of newer drugs for epilepsy in adults: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess.*, **9**, 1–157, iii–iv.
- Woodgett, J.R. (1990) Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.*, **9**, 2431–2438.
- Yeste-Velasco, M., Folch, J., Trullàs, R., Abad, M.A., Enguita, M., Pallàs, M., & Camins, A. (2007) Glycogen synthase kinase-3 is involved in the regulation of the cell cycle in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology*, **53**, 295–307.

Zhang, B. & Wong, M. (2012) Pentylentetrazole-induced seizures cause acute, but not chronic, mTOR pathway activation in rat. *Epilepsia*, **53**, 506–511.

Zhou, F.-Q. (2005) CELL BIOLOGY: GSK-3 and Microtubule Assembly in Axons. *Science* (80-.), **308**, 211–214.